

# **Mikrobielle Diversität in Biogasreaktoren**

## **D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum agriculturalarum

(Dr. rer. agr.)

**eingereicht an der  
Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin**

von

Dipl. Ing. Khadidja Souidi,  
03.09.1972, Alger Algerien

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Landwirtschaftlich-Gärtnerischen Fakultät:

Prof. Dr. Dr. h.c. Otto Kaufmann

Gutachter: 1. Prof. Dr. B. Linke  
2. Dr. M. Klocke  
3. Prof. Dr. G. Westphal

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Februar 2008

# Inhaltsverzeichnis

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Zusammenfassung.....</b>  | <b>IV</b>   |
| <b>Zusammenfassung (englisch) .....</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>Widmung.....</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>   | <b>X</b>    |
| <b>Danksagung .....</b>  | <b>XI</b>   |
| <b>1 Einleitung und Zielstellung .....</b>   | <b>1</b>    |
| <b>2 Stand der Forschung.....</b>  | <b>3</b>    |
| 2.1 Einzellige (Mikro-) Organismen: Prokaryoten und Eukaryoten.....                                | 3           |
| 2.1.1 Prokaryotische Mikroorganismen: Grundsätzlicher Aufbau .....                                 | 3           |
| 2.1.2 Prokaryotische Mikroorganismen: Bacteria.....  | 4           |
| 2.1.2.1 <i>Vorkommen und Lebensräume</i> .....   | 4           |
| 2.1.2.2 <i>Morphologie</i> .....   | 5           |
| 2.1.2.3 <i>Physiologie</i> .....   | 5           |
| 2.1.3 Prokaryotische Mikroorganismen: Archaea.....   | 5           |
| 2.1.3.1 <i>Vorkommen und Lebensräume</i> .....   | 6           |
| 2.1.3.2 <i>Morphologie</i> .....   | 6           |
| 2.1.3.3 <i>Physiologie</i> .....   | 7           |
| 2.1.3.4 <i>Taxonomie</i> .....   | 7           |
| 2.2 Methoden der mikrobiellen Taxonomie.....   | 9           |
| 2.2.1 Phänotypische Charakterisierung.....   | 10          |
| 2.2.1.1 <i>Charakterisierung der Morphologie</i> .....   | 10          |
| 2.2.1.2 <i>Charakterisierung der Physiologie</i> .....   | 11          |
| 2.2.2 Genotypische Charakterisierung.....  | 12          |
| 2.2.2.1 <i>Struktur der Ribosomen und Ribotyping</i> .....   | 13          |
| 2.2.2.2 <i>Nukleinsäure-Hybridisierung</i> .....   | 14          |
| 2.2.2.3 <i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)</i> .....                                     | 14          |
| 2.2.2.4 <i>Sequenzanalyse der RNA oder DNA</i> .....   | 15          |
| 2.2.2.5 <i>Analyse anderer Gene</i> .....  | 16          |
| 2.2.2.6 <i>Analyse des gesamten Genoms</i> .....   | 16          |
| 2.2.3 Bioinformatische Ressourcen .....  | 17          |
| 2.2.3.1 <i>National Center for Biotechnology Information (NCBI)</i> .....                          | 17          |
| 2.2.3.2 <i>Das Ribosomal Database Project (RDP)</i> .....  | 17          |
| 2.2.3.3 <i>Programme für den Vergleich von Nukleotidsequenzen: Clustal</i> ..                      | 17          |
| 2.2.3.4 <i>Programme für phylogenetische Analysen: MEGA</i> .....                                  | 18          |
| 2.3 Molekulargenetische Verfahren zur Analyse komplexer mikrobieller<br>Lebensgemeinschaften ..... | 19          |
| 2.3.1 Anlage einer 16S rDNA Bank .....   | 19          |
| 2.3.2 ARDRA (Restriktionsanalyse der amplifizierten 16S rDNA).....                                 | 19          |
| 2.3.3 Environmental Genomics.....  | 20          |

|          |  |           |
|----------|--|-----------|
| 2.4      | Anaerober Abbau von organischen Substanzen.....  | 20        |
| 2.4.1    | Hydrolyse .....  | 22        |
| 2.4.2    | Acidogenese .....  | 22        |
| 2.4.3    | Acetogenese .....  | 22        |
| 2.4.4    | Methanogenese.....   | 23        |
| 2.4.5    | Mikrobiologie der Fermentation .....   | 24        |
| 2.4.6    | Sulfatreduktion als konkurrierender Prozess der Fermentation und Methanogenese.....  | 25        |
| 2.4.7    | Mikrobiologie der Methanogenese .....  | 25        |
| 2.5      | Technische Systeme zur Erzeugung von Biogas .....  | 27        |
| 2.5.1    | Fermentationen mit granuliertem Schlamm.....   | 27        |
| 2.5.2    | Rührkessel-Reaktoren .....   | 27        |
| 2.5.3    | Anaerobe Festbettreaktoren mit Biofilm.....  | 27        |
| 2.5.4    | Substrate für die Biogasgewinnung .....  | 28        |
| <b>3</b> | <b>Material und Methoden .....</b>   | <b>30</b> |
| 3.1      | Bioreaktorbetrieb und Probennahme.....   | 30        |
| 3.1.1    | Betrieb des CSTR-Reaktors .....  | 30        |
| 3.1.2    | Betrieb des kombinierten Systems aus <i>leach-bed</i> Reaktor und Anaerobfilter .....  | 31        |
| 3.2      | DNA-Extraktion.....  | 32        |
| 3.3      | Vervielfältigung der prokaryotischen 16S rDNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....   | 33        |
| 3.4      | Klonierung und Reaktionsanalyse der amplifizierten 16S rDNA (ARDRA) .....  | 34        |
| 3.5      | Sequenzierung und phylogenetische Analyse.....   | 36        |
| 3.6      | Anlage von Stammkulturen .....   | 36        |
| <b>4</b> | <b>Ergebnisse .....</b>  | <b>37</b> |
| 4.1      | Mikrobielle Diversität in einer biogas-produzierenden Kofermentation von Maissilage und Rindergülle (Normaler Prozesszustand) .....  | 37        |
| 4.1.1    | Betrieb des CSTR.....  | 37        |
| 4.1.2    | Analyse der 16S rDNA Bibliotheken.....   | 38        |
| 4.1.2.1  | Domäne Archaea.....  | 39        |
| 4.1.2.2  | Domäne Bacteria .....  | 42        |
| 4.2      | Mikrobielle Diversität in einer biogas-produzierenden Kofermentation von Maissilage und Rindergülle (Unnormaler Prozesszustand mit stark erhöhten pH-Werten nach zu starker Belastung) ..... | 50        |
| 4.2.1    | Betrieb des CSTR.....  | 51        |
| 4.2.2    | Analyse der 16S rDNA Bibliotheken.....   | 51        |
| 4.2.2.1  | Domäne Archaea.....  | 53        |
| 4.2.2.2  | Domäne Bacteria .....  | 54        |
| 4.3      | Mikrobielle Diversität in einer biogas-produzierenden zweistufigen Fermentation von Triticale-Silage (Normaler Prozesszustand) .....   | 62        |

---

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 4.3.1    | Betrieb des Reaktors .....   | 62         |
| 4.3.2    | Analyse der 16S rDNA Bibliotheken.....   | 63         |
| 4.3.2.1  | <i>Leach-bed Reaktor (Stufe 1) – Vergärung der Silage</i> .....  | 64         |
| 4.3.2.2  | <i>Festbett-Anaerobfilter (Stufe 2) – Methanogenese-Stufe</i> .....  | 67         |
| 4.4      | Der Vergleich der detektierten Archaea OTU innerhalb der untersuchten Biogasreaktoren (CSTR im Normal- und Übersäuerungs-Zustand, zweistufiges Reaktorsystem)..... | 69         |
| <b>5</b> | <b>Diskussion .....</b>  | <b>71</b>  |
| 5.1      | Methodische Aspekte .....  | 71         |
| 5.1.1    | Eignung der molekularen Analyse zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität.....  | 71         |
| 5.1.1.1  | <i>DNA-Isolierung und Reinigung</i> .....  | 71         |
| 5.1.2    | Selektivität der Primer .....  | 74         |
| 5.1.2.1  | <i>PCR-Primer zum Nachweis von Archaea</i> .....   | 75         |
| 5.1.2.2  | <i>PCR-Primer zum Nachweis von Bacteria</i> .....  | 77         |
| 5.1.3    | Einfluss des PCR-Regimes .....   | 79         |
| 5.2      | Die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in anaeroben Degradierungsprozessen ..   | 80         |
| 5.2.1    | Die fermentativen Bacteria in Biogasreaktoren .....  | 80         |
| 5.2.2    | Die methanbildenden Archaea in Biogasreaktoren.....  | 82         |
| 5.2.2.1  | <i>Hydrogenotrophe Methanbildner</i> .....   | 82         |
| 5.2.2.2  | <i>Acetotrophe Methanbildner</i> .....   | 84         |
| 5.2.2.3  | <i>Unbekannte Archaea-Gruppen</i> .....  | 85         |
| 5.2.3    | Unbekannte Mikroorganismen in den Biogasreaktoren.....   | 85         |
| 5.2.4    | Änderung der Mikrobiologie während einer Übersäuerung des Reaktors....   | 86         |
| <b>6</b> | <b>Schlussfolgerungen.....</b>   | <b>88</b>  |
|          | <b>Literaturverzeichnis.....</b>   | <b>90</b>  |
|          | <b>Abbildungsverzeichnis.....</b>  | <b>101</b> |
|          | <b>Tabellenverzeichnis.....</b>  | <b>103</b> |
|          | <b>Anhang .....</b>  | <b>104</b> |
|          | <b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>  | <b>145</b> |

## Zusammenfassung

Die Effizienz von Biogasreaktoren hängt in wesentlichem Maße von der Substratverwertung durch die beteiligte Mikroflora ab. Die genaue Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft ist jedoch bislang nur oberflächlich charakterisiert. In dieser Studie wird daher eine Übersicht über die mikrobielle Diversität in verschiedenen Biogasreaktorentypen (CSTR, *Leach-bed*-Reaktor, Festbett-Anaerobfilter) während der Fermentation verschiedener, pflanzlicher Substrate (Mais-, Rüben-, Triticale-Ganzpflanzensilage als NawaRo-Pflanzen, teilw. in Kofermentation mit Rindergülle) gegeben. Die Charakterisierung der Mikrobiologie erfolgte mittels der Entwicklung und nachfolgenden bioinformatischen Analyse von 16S rDNA Bibliotheken.

- (1) Aufgrund des stark mit organischen Verbindungen wie Huminsäuren angereicherten Materials aus den beprobten Biogasreaktoren war die Fortentwicklung bestehender Laborprotokolle zur DNA-Isolierung und -Reinigung erforderlich. Ebenso wurden die bestehenden Primer für die Vermehrung der 16S rDNA von methanogenen Archaea mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aufgrund von *in silico* Analysen bekannter 16S rDNA Sequenzen verbessert.
- (2) Es wurden insgesamt sechs 16S rDNA Bibliotheken konstruiert. Insgesamt umfassten diese sechs 16S rDNA Bibliotheken 627 Klone. Mittels der zugehörigen *fingerprint*-Muster (*amplified rDNA restriction analysis*, ARDRA) wurden innerhalb der sechs 16S rDNA Bibliotheken 223 taxonomische Gruppen (*operational taxonomic units*, OTU) detektiert.
- (3) Jeweils vier 16S rDNA Bibliotheken wurden spezifisch für methanogene Archaea und zwei Banken spezifisch für fermentative Bacteria konstruiert. Zur Erfassung der Archaea wurden 402 Klone analysiert. Für die Erfassung der Bacteria wurden 283 Klone untersucht. Damit wurden 114 Archaea OTU sowie 109 Bacteria OTU detektiert.
- (4) In einem Rührkesselreaktor (*completely stirred tank reactor*, CSTR) in einer biogas-produzierenden Kofermentation von Maissilage und Rindergülle bei einem als normal anzusehenden Prozesszustand wurde eine hohe Diversität innerhalb der methanogenen Archaea gefunden. Acht OTU wurden für die Ordnung Methanomicrobiales, drei OTU für die Ordnung Methanosarcinales und zwei OTU für die Ordnung Methanobacteriales nachgewiesen. Innerhalb der entsprechenden 16S rDNA Bibliothek traten am häufigsten OTU der ausschließlich hydrogenotrophen

Methanomicrobiales (85 % aller detektierten Archaea Klone) auf. Vertreter der teilweise auch acetotrophen Methanosarcinales wurden bei 21 % der Klone detektiert.

- (5) Die Analyse der Diversität innerhalb der Domäne Bacteria ergab für den CSTR bei der Konfermentation von Maissilage und Gülle im Normalzustand eine hohe Diversität unter den Vertretern der Phyla Firmicutes (27 OTU) (47 % aller detektierten Klone der Bacteria 16S rDNA Bibliothek) und Bacteroidetes (13 OTU) (14 % aller Klone). Ebenso wurden mehrere OTU der Phyla Proteobacteria (4 OTU), Spirochaetes (2 OTU), Fibrobacteres (1 OTU) und Chloroflexi (1 OTU) detektiert. 10 OTU konnten taxonomisch nicht eingeordnet werden.
- (6) Mit dem Wechsel des CSTR in einen unnormalen Prozesszustand mit stark erniedrigten pH-Werten (pH 5,8) wurden weniger Archaea OTU detektiert. Als einzige Ordnung wurde Methanomicrobiales detektiert (4 OTU). Die gefundenen Vertreter dieser Ordnung stammen ausschließlich aus den Gattungen Methanocorpusculum und Methanoculleus, welche nur hydrogenotrophe Methanbildner umfasst.
- (7) Die Diversität innerhalb der Domäne Bacteria bleibt auch bei einer Übersäuerung des CSTR erhalten. Unter 51 erfassten OTU wurden Vertreter der Firmicutes am häufigsten nachgewiesen (27 OTU). Von diesen wiederum konnten die meisten OTU (21 OTU) der Klasse Clostridia zugeordnet werden. Ein weiterer Beleg für die Dominanz der Clostridia ist die Häufigkeit der entsprechenden OTU innerhalb der 16S rDNA Bibliothek: 64 % der untersuchten Klone wiesen einen der entsprechenden ARDRA-*fingerprint*-Muster auf. Weiterhin wurden Vertreter der Phyla Bacteroidetes (12 OTU), der Proteobacteria (6 OTU) sowie der Spirochaetes (1 OTU) gefunden; eine OTU konnte taxonomisch nicht eingeordnet werden.
- (8) Jüngste technische Entwicklungen zur Fermentation von NawaRo-Pflanzen beruhen auf dem Prinzip, die Hydrolyse/Versäuerung von Methanogenese zu trennen. In dieser Arbeit wurde daher auch die Archaea-Diversität in einem solchen zweistufigen System bestehend aus *leach-bed*-Reaktor (LBR, Acetogenese) und Festbett-Anaerobfilter (AF, Methanogenese) bei der Monovergärung von Triticale-Ganzpflanzensilage untersucht. Zwei Archaea 16S rDNA Banken wurden konstruiert, welche 137 (LBR) und 168 Klone (AF) umfassen. In diesen beiden Banken konnten insgesamt 77 verschiedene OTU detektiert werden. Ebenso wie in dem CSTR wurde die größte Diversität innerhalb der Ordnung Methanomicrobia-

les mit 14 OTU (LBR) bzw. 12 OTU (AF) detektiert. Potentielle acetotrophe Methanbildner der Ordnung Methanosarcinales wurden in LBR und AF mit jeweils 4 OTU nachgewiesen. Methanobacteriales waren mit 4 OTU (LBR) bzw. 1 OTU (AF) vertreten.

- (9) In allen untersuchten Reaktoren wurden sowohl für Archaea als auch Bacteria eine Reihe von OTU detektiert, welche größere genetische Distanzen zu den bislang bekannten Typenarten aufwiesen. Beispielhaft hierfür sind die Archaea der CA-11 und ARC-I Gruppe, welche in dem zweistufigen Biogasreaktor mit mehreren OTU nachgewiesen wurden.
- (10) Die Dominanz von OTU verwandt mit H<sub>2</sub>-konsumierenden Methanbildnern in der Archaea-spezifischen 16S rDNA Bibliotheken sowie deren große Diversität sind Indizien für eine verstärkte Bildung von Methan durch Oxidation von CO<sub>2</sub>. In diesem Falle würde die Verwertung des Acetats überwiegend durch syntrophe Bacteria erfolgen.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Analyse der mikrobiellen 16S rDNA Sequenz mittels der Konstruktion von DNA-Bibliotheken und nachfolgendem Screening mittels der ARDRA-*fingerprint*-Methode ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften in Biogas-Reaktoren trotz der Komplexität des Substrates und der beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft darstellt. Diese häufig in der mikrobiellen Umweltforschung angewandte molekulare Methode liefert eine schnelle und umfassende Information über die Struktur und die Entwicklung von mikrobiellen Systemen. Ebenso wird damit die Identifizierung der beteiligten Arten möglich. Im Vergleich mit den klassischen mikrobiologischen Ansätzen stellt die neue molekulare Untersuchung eine sehr attraktive Technik dar, um eine Einsicht in die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in technischen Ökosystemen zu erhalten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden wie folgt publiziert:

*Referierte Artikel in Fachzeitschriften*

Klocke, M.; Nettmann, E.; Bergmann, I.; Mundt, K.; **Souidi, K.**; Mumme, J.; Linke, B. (*im Druck*): Characterization of the methanogenic Archaea within two-phase biogas reactor systems operated with plant biomass. Systematic and Applied Microbiology.

**Souidi, K.**; Mumme, J.; Mundt, K.; Nettmann, E.; Bergmann, I.; Linke, B.; Klocke, M. (2007): Microbial diversity in a biogas-producing co-fermentation of maize silage and bovine manure. Agrartechnische Forschung / Agricultural Engineering Research 13 (6): 197-206.

Klocke, M.; Mähnert, P.; Mundt, K.; **Souidi, K.**; Linke, B. (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate. Systematic and Applied Microbiology 30 (2): 139 - 151.

*Beiträge zu Sammelwerken*

Klocke, M.; Mundt, K.; Nettmann, E.; **Souidi, K.**; Bergmann, I.; Mumme, J.; Schönberg, M.; Linke, B. (*im Druck*): Diversity of methanogenic Archaea in silage-utilizing two-phase biogas reactors. In: European Society of Agricultural Engineers [Ed.]: Proceedings of the International Conference on Agricultural Engineering & Industry Exhibition AgEng2008 - Agricultural and Biosystems Engineering for a Sustainable World, Hersonissos, Crete, Greece, 23. - 25. Juni 2008.

Klocke, M.; Mundt, K.; Nettmann, E.; Bergmann, I.; **Souidi, K.**; Linke, B. (2008): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. Biospektrum 2008S: 96.

Klocke, M.; Nettmann, E.; Mundt, K.; **Souidi, K.**; Bergmann, I.; Linke, B. (2007): Diversity of methanogenic Archaea in biogas reactors. Journal of Biotechnology 131 (2S): S123-S124.

*NCBI GenBank Akzessionen*

Nukleotidsequenzen EF680342 - EF680376

Nukleotidsequenzen EF686879 - EF686999



## **Zusammenfassung (englisch)**

The efficiency of biogas reactors depends on the substrate utilisation by the involved microbial community. However, the exact composition of the microbial biocoenosis was rudimental characterized. In this study an overview of the microbial diversity in different anaerobic biogas reactor types (CSTR, leach bed reactor, fixed bed anaerobic filter) is given for the fermentation of different substrates (corn-, carrots-, triticale whole crop silage as renewable raw materials, partly in co-fermentation with cattle liquid manure). The characterisation of the microbial community was conducted via the construction of 16S rDNA libraries for both, methanogenic Archaea and fermentative Bacteria. Individual taxonomic groups within the 16S rDNA libraries were determined by means of amplified rDNA restriction analysis (ARDRA). The taxonomic classification of these groups was performed via a phylogenetic analysis of representative 16S rDNA sequences. In total six 16S rDNA libraries with 627 clones were developed. Together 223 taxonomic groups were detected; from these 114 was assigned to the domain Archaea and further 109 was assigned to the domain Bacteria. Within the examined biogas reactors a high diversity was found within the hydrogenotrophic methane producing Archaea, acetotrophic methane producing Archaea appears only with a comparatively small diversity. From the domain Bacteria fermentative species of phylum Firmicutes especially of the genus *Clostridium* were found to be dominant in the microbial community.

## **Widmung**

Für meine liebe Mama und für die Seele von meinem lieben Papa.

## Abkürzungsverzeichnis

|                |  |
|----------------|--|
| AF             | Festbett-Anaerobfilter                                     |
| ARDRA          | <i>amplified rDNA restriction analysis</i>                 |
| ATP            | Adenosintriphosphat  |
| BLAST          | <i>basic local alignment search tool</i>                   |
| bp             | Basenpaar  |
| cDNA           | Komplementäre DNA  |
| CSTR           | <i>completely stirred tank reactor</i> (Rührkesselreaktor) |
| CTAB           | Cetyltrimethylammoniumbromid                               |
| DGGE           | Denaturierende-Gradientengelelektrophorese                 |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                                     |
| dNTP           | Desoxyribonukleosidtriphosphat                             |
| EEG            | Erneuerbare-Energien-Gesetzes                              |
| ESGB           | <i>expanded granular sludge blanket</i>                    |
| FAME           | <i>fatty acid methyl esters</i> (Fettsäureanalyse)         |
| FID            | Flammenionisationsdetektor                                 |
| FISH           | Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung                |
| F <sub>M</sub> | Frischmasse  |
| Forw           | <i>forward</i>   |
| LBR            | <i>leach-bed reactor</i>                                   |
| <i>mcr</i>     | Methyl-Coenzym-Reduktase                                   |
| NawaRo         | Nachwachsende Rohstoffe                                    |
| NVBI           | <i>National Center for Biotechnology Information</i>       |
| orgS           | organische Säuren  |
| oTS            | organische Trockensubstanz                                 |
| OTU            | <i>operational taxonomic units</i>                         |
| PCR            | Polymerase-Kettenreaktion                                  |
| PVPP           | Polyvinylpolypyrrolidon                                    |
| rDNA           | Ribosomaler Desoxyribonukleinsäure                         |
| RDP            | <i>Ribosomal Database Project</i>                          |
| Rev            | <i>reverse</i>   |
| RFLP           | Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus                   |
| RNA            | Ribonukleinsäure   |
| rRNA           | Ribosomale Ribonukleinsäure                                |
| S              | Svedberg-Einheit   |
| SDS            | Sodiumdodecylsulfat  |
| TS             | Trockensubstanz  |
| UASB           | <i>upflow anaerobic sludge blanket</i>                     |
| UBF            | <i>upflow sludge bed filters</i>                           |
| VFA            | <i>volatile fatty acids</i>                                |

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Linke vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) für die Betreuung dieser Dissertation ganz herzlich bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Michael Klocke vom Leibniz-Institut für Agrartechnik Potsdam-Bornim e.V. (ATB) für die Bereitstellung des Themas und die Betreuung meiner Doktorarbeit.

Danken möchte ich allen Mitgliedern der Abteilung 1, die mir mit Ratschlägen und Hilfe zur Seite gestanden haben. Regina Hager und Kerstin Mundt danke ich für so manche Einweisung und Hilfe im Umgang mit der Arbeit.

Meinen Bürokollegen Pia Mähnert, Edith Nettman, Jan Mumme danke ich für die gute Zusammenarbeit, die angenehme Arbeitsatmosphäre und so manchen Motivations-schub.

Großer Dank geht auch an meine Mutter sowie an meine Geschwister Fatima, Fadila und Tarik für die moralische Unterstützung.

## **1 Einleitung und Zielstellung**

In den siebziger Jahren begannen viele europäische Organisationen mit der Suche nach alternativen Energieträgern als Ersatz für fossile Brennstoffe und Nuklearenergie. Im Vordergrund stehen hierbei erneuerbare Energiequellen. Durch die seitdem kontinuierlich steigenden Kosten für fossile Brennstoffe weltweit liefert die Nutzung von Biogas einen sehr effektiven Beitrag, die Energiekosten zu reduzieren.

Mit dem Inkrafttreten des „Erneuerbare-Energien-Gesetzes“ (EEG) im Jahr 2000 zum Aufbau einer nachhaltigen Energieversorgung für Klima-, Natur- und Umweltschutz haben sich die gesetzlichen Rahmenbedingungen für den Betrieb von Biogasanlagen entscheidend verbessert. Das EEG will zudem einen Beitrag zur Vermeidung von Konflikten um fossile Rohstoffe leisten.

In Europa wurden 1999 aus Biogas 9805 GWh Energie erzeugt. Deutschland, Spanien und Schweden sind hierbei die Länder mit der höchsten Produktion.

Mit einer im Jahr 2000 garantierten Vergütung von 0,101 € pro eingespeister Kilowattstunde Strom für die kommenden 20 Jahre wurde eine verlässliche Kalkulationsbasis für eine Investitionsentscheidung in die Biogastechnologie geschaffen. Um die positive Entwicklung der erneuerbaren Energien in allen Bereichen weiter voranzutreiben und das EEG an die Entwicklung anzupassen, wurde es zum 1. August 2004 novelliert. Ziele des novellierten EEG sind insbesondere, den Anteil der erneuerbaren Energien an der gesamten Stromversorgung auf mindestens 12,5 % bis zum Jahr 2010 und auf mindestens 20 % bis zum Jahr 2020 zu steigern. Das novellierte EEG sieht feste Tarife vor, mit denen Netzbetreiber die Einspeisung von Strom aus Biomasse aber auch anderen erneuerbaren Energiequellen zu vergüten haben. Die nach Energieträgern gestaffelten Mindestvergütungen variieren je nach Anlagengröße, bei Biomasseenergie wird zudem ein Bonus für die Verwendung von nachwachsenden Rohstoffen (NawaRo) gezahlt. Die Vergütungssätze für Strom liegen nach dem neuen EEG für das Jahr 2005 zwischen 8,4 - 11,50 € ct/kWh für Strom aus Biomasse, als Bonus wird zusätzlich zwischen 4 und 6 ct/kWh garantiert (ANONYMUS 2004).

Aktuell (2007) liegt die Stromproduktion aus Biogas in Deutschland bei 3,9 Mrd. Kilowattstunden. Die etwa 3500 Biogasanlagen erzeugten 2006 insgesamt deutlich über 5 Mrd. Kilowattstunden Biogasstrom (FACHVERBAND BIOGAS 2007).

Trotz der Förderung durch Bund und Länder und des in Folge schnellen Anstiegs der Zahl der Biogasanlagen auf NawaRo-Basis bzw. der von diesen produzierten Energie ist die Grundlage der Biogas-Entstehung, nämlich das Wirken einer komplexen und vielseitigen Lebensgemeinschaft aus verschiedenartigsten Mikroorganismen, bislang nur ansatzweise verstanden. Die Untersuchung der Zusammensetzung und der Dynamiken in einer solchen mikrobiellen „*black box*“ wird möglich durch neue Techniken der Molekularbiologie.

Ein in der mikrobiologischen Umweltanalytik weit verbreitetes Verfahren ist die Analyse eines als taxonomischen Standard definierten Gens für die ribosomale 16S rRNA. Hierzu wird aus einer Probe aus dem Biogasreaktor zuerst die gesamte Zellmasse angereichert und dann aus dieser die gesamte mikrobielle DNA isoliert. Aus der DNA wiederum lässt sich die Gensequenz der 16S rRNA (= 16S rDNA) mittels einer Polymerasekettenreaktion (PCR) gezielt anreichern. Die Anreicherung kann hierbei sowohl für alle Mikroorganismen als auch selektiv für einzelne taxonomische Gruppen erfolgen. Eine Trennung der 16S rDNA Fragmente wird erreicht durch deren Überführung in *Escherichia coli* Zellen, welche sich dann durch einen klassischen Ausstrich auf Agarplatten vereinzeln lassen (= 16S rDNA Bibliothek oder 16S rDNA Klonbank). Mittels einer *fingerprint*-Analyse (*amplified rDNA restriction analysis*, ARDRA) können die einzelnen Zelllinien bzw. die enthaltenen 16S rDNA Sequenzen in taxonomische Gruppen eingeteilt werden. Die genaue Taxonomie solcher Gruppen ergibt sich aus der Bestimmung der genauen Nukleotid-Sequenz der 16S rDNA in einer Zelllinie repräsentativ für eine Gruppe mit gemeinsamen *fingerprint*-Muster und deren nachfolgender Einordnung in das bestehende taxonomische System der Mikroorganismen durch eine bioinformatische Auswertung.

In dieser Studie wurde die Diversität der Bacteria- und der Archaea-Gemeinschaften in verschiedenen Konstruktionen von Biogasreaktoren (CSTR, *Leach-bed*-Reaktor, Festbett-Anaerobfilter) während der Fermentation verschiedener, vorrangig pflanzlicher Substrate (Mais-, Rüben-, Triticale-Ganzpflanzensilage als NawaRo-Pflanzen, teilweise in Kofermentation mit Rindergülle) mittels molekulargenetischer Verfahren untersucht. Ziel ist neben der Weiterentwicklung der existierenden Laborprotokolle aus der Umweltmikrobiologie für die Bearbeitung von Proben aus Biogasreaktoren insbesondere die Beschreibung der mikrobiellen Biozönose und hierbei vorrangig der Mikroorganismen, welche an dem Abbau der Biomasse (= fermentive Bacteria) sowie an der Methanbildung (= methanogene Archaea) beteiligt sind.

## **2 Stand der Forschung**

### **2.1 Einzellige (Mikro-) Organismen: Prokaryoten und Eukaryoten**

Zwei Grundtypen von zellulären Strukturen existieren auf der Erde die prokaryotischen und die eukaryotischen Zellen.

Im Gegensatz zu den Eukaryoten besitzen die Prokaryoten keinen echten durch eine Membran separierten Zellkern und weisen eine grundsätzlich einfachere Struktur auf. Zu den eukaryotischen Mikroorganismen gehören Algen, Pilze und Protozoen. Alle Tiere und Pflanzen sind als multizelluläre Organismen ebenfalls aus eukaryotischen Zellen aufgebaut. Zu Prokaryoten gehören die Bakterien (taxonomisch: Bacteria) und die Archaeobakterien oder Archeen (taxonomisch: Archaea).

#### **2.1.1 Prokaryotische Mikroorganismen: Grundsätzlicher Aufbau**

Zu den prokaryotischen Organismen werden in der Mikrobiologie alle mikroskopisch kleinen, einzelligen Organismen gezählt, welche keinen echten Zellkern besitzen. Im Unterschied zu eukaryotischen Zellen liegt die prokaryotische DNA frei im Cytoplasma.

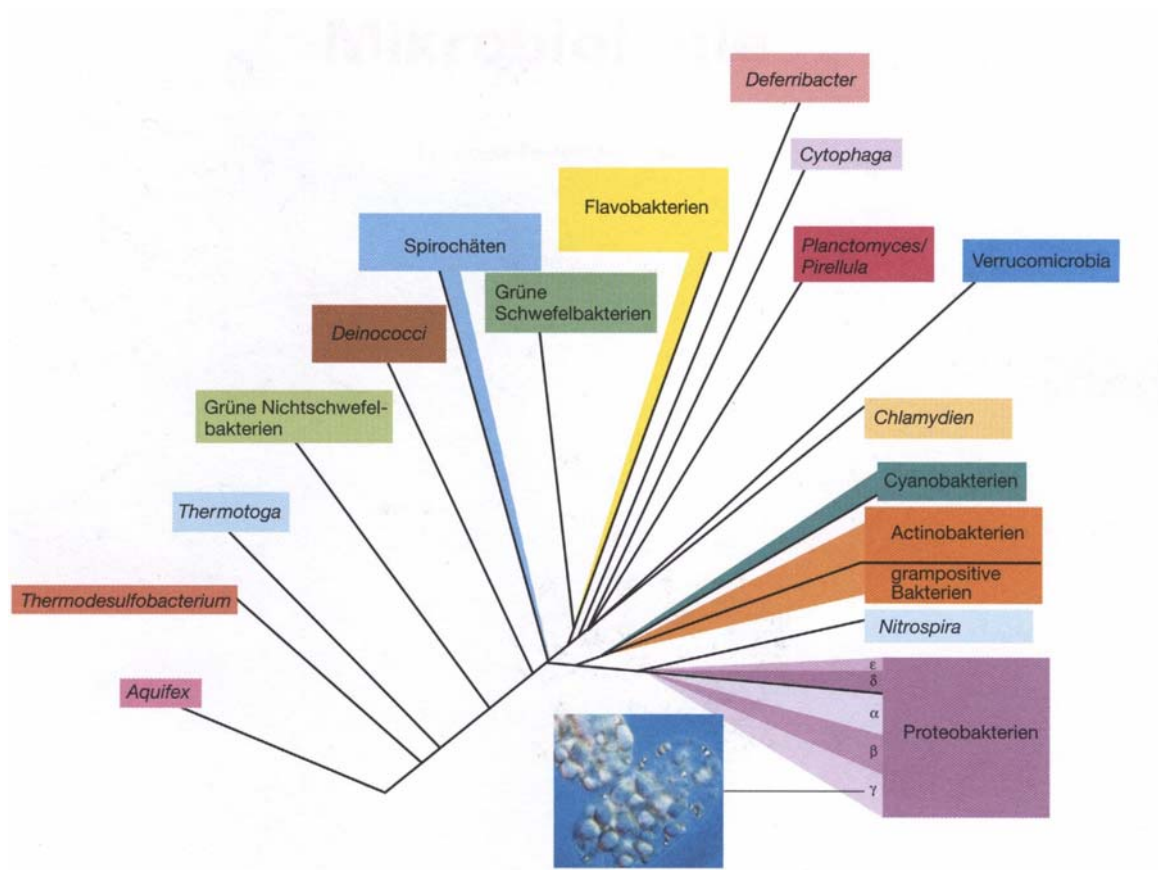
Die DNA von prokaryotischen Zellen liegt als ein grosses doppelsträngiges Molekül vor, sie ist bei den Meisten ringförmig. Die meisten Prokaryoten besitzen nur ein einziges Chromosom. Zusätzlich enthalten viele Prokaryoten auch ein bis mehrere Plasmide mit zusätzlicher Geninformation (extrachromosomale DNA).

Als ein gutes Beispiel: Das Chromosom des Darmbakteriums *Escherichia coli* besteht aus 4,64 Millionen Basenpaaren, welche die Information zum Aufbau von 4288 Proteinen kodieren. Die Abfolge der genauen DNA-Sequenz ist seit 1997 bekannt (BLATTNER ET AL. 1997).

Als weitere Zellbestandteile besitzen alle prokaryotischen Zellen Cytoplasma, Cytoplasmamembran und Ribosomen, die meisten Prokaryoten besitzen zusätzlich eine Zellwand. Prokaryoten verfügen im Unterschied zu eukaryotischen Zellen über keine Organellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten innerhalb ihrer Zellen.

### 2.1.2 Prokaryotische Mikroorganismen: Bacteria

Die größte Artenvielfalt innerhalb der prokaryotischen Mikroorganismen wird durch Organismen gebildet, welche taxonomisch in die Domäne Bacteria eingeordnet werden (Abb. 1).



**Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Bacteria abgeleitet aus dem Vergleich der 16S rDNA Sequenzen**

Die bakterielle Zelle hat eine durchschnittliche Größe von 0,5 - 1  $\mu\text{m}$ , manche Bacteria wie z. B. *Thiomargarita nambiensis* können eine Größe von bis zu 750  $\mu\text{m}$  aufweisen.

#### 2.1.2.1 Vorkommen und Lebensräume

Organismen der Domäne Bacteria sind in der Natur in allen terrestrischen und aquatischen Lebensräumen verbreitet. Temporär kommen sie auch in der Atmosphäre vor (Luftkeime). Viele Arten leben auf anorganischen und organischen Oberflächen, Bacteria sind aber auch häufig im Erdboden oder sogar in Gesteinsschichten zu finden. Selbst



extreme Habitate wie z.B. trockene und intensiv bestrahlte Wüstenböden, werden von Bacteria besiedelt.

In aquatischen Lebensräumen kommen viele Bacteria in allen Zonen von Süßwasserseen und Salzwasserhabitaten vor. Ebenfalls werden extreme Umwelten besiedelt, wie z.B. heiße Quellen, Schwefelquellen, Salzseen, Sodaseen und Salinen.

#### 2.1.2.2 Morphologie

Ursprünglich wurden die Bacteria ausschließlich nach ihrer Zellform taxonomisch eingeordnet, wie z.B. als Kokken, als Stäbchen oder als Spirillen. Einige Bacteria sind weiterhin in der Lage Kapseln oder verschiedenartige Sporen als Anpassung an extreme Bedingungen zu bilden. Solche Bacteria wurden als eigene Gruppe, die Endosporenbildner, geführt.

#### 2.1.2.3 Physiologie

Die Lebensweise und der Stoffwechsel der Bacteria sind sehr unterschiedlich. So gibt es Bacteria, die aerob sind, d.h. welche Sauerstoff benötigen. Für obligat anaerobe Bacteria ist dagegen Sauerstoff Gift, während fakultative Bacteria sowohl Sauerstoff auch Sauerstoffmangel aushalten. Einige Bakterien sind phototroph, die meisten sind dagegen chemotroph. Von den Chemotrophen sind die meisten heterotroph, einige chemoautotroph und lithoautotroph.

### 2.1.3 Prokaryotische Mikroorganismen: Archaea

Neben den Eukaryota und den Bacteria existiert als dritte große Organismengruppe die Domäne der Archaea. Wie die Bacteria handelt es sich bei den Archaea ausschließlich um prokaryotische Mikroorganismen.

Archaea wurden erstmals 1970 von WOESE beschrieben [WOESE1970]. Obwohl einige Archaea sehr ungewöhnliche Zellformen haben, wie z.B. polygonale Zellen oder unregelmäßige Kokken, lassen sich die Archaea in Größe und Form nicht grundsätzlich von den Bacteria unterscheiden.

### 2.1.3.1 Vorkommen und Lebensräume

Archaea lassen sich besonders häufig in extremen Biotopen finden. Beispiele hierfür sind hyperthermophile Archaea, die bei sehr hohen Temperaturen (über 80 °C) wachsen, acidophile oder alkaliphile Archaea, die sehr niedrige bzw. sehr hohe pH-Werte benötigen, und die auch unter hohen Salzkonzentrationen lebenden halophilen Archaea.

Hyperthermophile Archaea findet man oft in vulkanischen Lebensräumen, die Temperaturen bis zu 100 °C erreichen können. Solche Lebensräume sind heiße Quellen im Yellowstone National Park (USA) oder sog. *black smoker*, unterseeische geothermale Quellen in der Tiefsee. Aus letzterem Lebensraum wurden u.a. Archaea-Gattungen wie *Sulfolobus*, *Acidianus* und *Pyrolobus* isoliert.

Hypersaline Habitate von Archaea liegen meistens in den heißen und trockenen Regionen der Welt. Beispiele für solche Habitate sind der Grosse Salzsee in Utah (USA) oder das Tote Meer im nahen Osten. Als einer der ersten Vertreter der extrem-halophilen Archaea wurde die Gattung *Halobacterium* beschrieben.

Ebenfalls häufig anzutreffen sind Vertreter der Archaea in anoxischen Habitaten wie Sümpfen, Seesedimenten und Reisfeldern. Hier finden sich vorrangig methanbildende Archaea (methanogene Archaea). Methanogene Archaea sind ebenfalls Teil der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in tierischen Verdauungsorganen wie dem Rumen von Wiederkäuern oder dem Caecum von Pferden.

### 2.1.3.2 Morphologie

Archaea unterscheiden sich von Bacteria und Eukaryota durch den Aufbau und die Struktur der Zellwände. Die Zellwände bestehen aus Pseudopeptidoglycan, Polysacchariden, Proteinen oder Glyceroproteinen (KANDLER & KÖNIG, 1998). Im Unterschied zu Bacteria enthalten die Zellwände nicht das für Bacteria typische Murein bzw. Peptidoglykan. Aufgrund des anderen Aufbaus von Zellmembran und Zellwand sind die Archaea unempfindlich gegen die Antibiotika, welche die bakterielle Zellsynthese stören.

Archaea haben wie die Bacteria auch verschiedene Größen und Formen. Die Größen von archaellen Zellen liegen zwischen 0,4 µm (*Nanoarchaeum equitans*) bis zu 100 µm (*Methanospirillum hungatei*), durchschnittlich sind Zellgrößen von etwa 1 µm üblich. Die Zellformen variieren von Kokken (z.B. *Methanococcus jannaschii*), gelappten

Kokken (z.B. *Archaeoglobus fulgidus*), Stäbchen (z.B. *Thermoproteus neutrophilus*), Spirillen (z.B. *Methanospirillum hungatei*), Scheiben (z.B. *Thermodiscus maritimus*), quadratischen Zellen (z.B. *Haloquadratum walsbyi*) bis hin zu langen Filamenten (z.B. *Thermofilum pendens*). Zur Bewegung können Archaea Flagellen oder Pili besitzen.

#### 2.1.3.3 Physiologie

Die Archaea umfassen physiologisch vielfältige Organismen. Mehrere Archaea sind autotroph, sie gewinnen den Kohlenstoff ausschließlich durch Assimilation von Kohlendioxid. Aber auch die heterotrophe Lebensweise, d.h. die Gewinnung des Kohlenstoffs aus organischen Verbindungen, ist weit verbreitet. Die Mehrzahl der bisher kultivierten Archaea zeichnet sich durch einen anaeroben Stoffwechsel aus; häufig ist für diese Archaea Sauerstoff sogar toxisch.

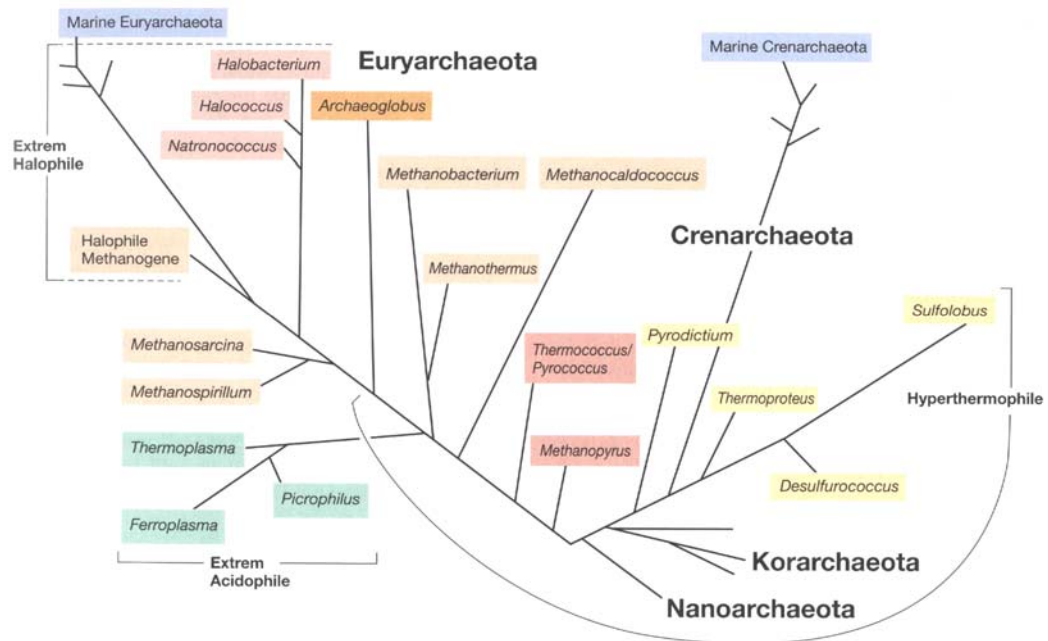
Die Methanogenese ist eine Besonderheit des Stoffwechsels von manchen Archaea. Diese Archaea werden häufig als methanproduzierende Archaea oder als Methanogene bezeichnet. Methanogene Archaea besitzen zur Methanogenese eine Reihe spezieller Cofaktoren wie z.B. Methyl-Coenzym M, Methanofuran, Methanopterin, Coenzym F<sub>420</sub>, Faktor F<sub>430</sub>.

Hyperthermophile Archaeen sind in den meisten Fällen Anaerobier. Der energiegewinnende Stoffwechsel ist entweder chemoorganotroph oder chemolithotroph, d.h. die lebensnotwendige Energie wird aus der chemischen Umsetzung von organischen bzw. anorganischen Verbindungen gewonnen. Schwefelverbindungen spielen hierbei oft eine große Rolle: Während des Stoffwechsels wird der Schwefel reduziert und dabei Stoffwechselenergie frei.

Halophile Archaea sind meist aerob und chemoorganotroph. Diese Organismen gewinnen ihre Energie aus chemischen Umsetzungen von organischen Verbindungen.

#### 2.1.3.4 Taxonomie

Taxonomisch gliedert sich die Domäne der Archaea in vier Phyla. Das bislang artenreichste Phylum ist das Phylum Euryarchaeota. Weitere Phyla bilden die Phyla Crenarchaeota, Korarchaeota und Nanoarchaeota, welche ausschließlich extremophile Arten umfassen (Abb. 2).



**Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der Archaea entwickelt aus dem Vergleich der 16S rDNA Sequenzen [MADIGAN und MARTINKO 2006]**

### *Euryarchaeota*

Das Phylum Euryarchaeota stellt eine diverse Gruppe der Archaea dar. Zu diesem Phylum gehören u.a. die methanogenen Archaea, die für die Bildung von Methan ( $\text{CH}_4$ ) verantwortlich sind.

Ebenfalls zu diesem Phylum gehören Vertreter der extrem halophilen Archaea (z.B. *Halobacterium* sp.) und der hyperthermophilen Archaea (z.B. *Thermococcus* sp. und *Pyrococcus* sp.). Unter letzteren finden sich auch methanogene Arten wie *Methanopyrus* sp.

### *Crenarchaeota*

Durch Analysen der molekularen Struktur der DNA (16S rDNA Analyse) konnte ein zweites Phylum Crenarchaeota neben den Euryarchaeota etabliert werden. Crenarchaeota leben in extrem heißen Lebensräumen wie z.B. kochenden Schlammquellen, wo Temperaturen von bis zu 100 °C erreicht werden. Andererseits findet man Vertreter der Crenarchaeota auch in sehr kalten Lebensräumen, z.B. in marinen Gewässern in der Nähe der Antarktis bei Temperaturen von unter 0 °C.

### *Korarchaeota*

Korarchaeota sind eine erst vor kurzem entdeckte Gruppe der Archaea, die zu den ursprünglichsten aller Lebensformen gehört.

Vertreter des Phylums Korarchaeota wurden erstmals 1996 VON BARNS ET AL. in einer heißen Quelle im Yellowstone National Park (USA) nachgewiesen. Dieser Nachweis erfolgte zuerst ausschließlich durch die molekulare Analyse der DNA in Proben aus dieser Quelle (16S rDNA). In dem phylogenetischen Baum liegen diese Organismen nahe der Wurzel des Archaea Baums.

### *Nanoarchaeota*

2002 hat HOHN ET AL. ebenfalls in einer heißen Quelle im Yellowstone National Park (USA) einen Mikroorganismus nachweisen können, welcher keinem der bislang bekannten Phyla taxonomisch zu zuordnen war. Hohn et al. definierten daher ein viertes Phylum, die *Nanoarchaeota*. Als einzige Gattung des Phylums wurde bislang *Nanoarchaeum* beschrieben.

*Nanoarchaeum* lebt in Symbiose mit oder als Parasiten auf dem Crenarchaeota *Ignicoccus*. *Nanoarchaeum* konnte daher bisher nicht in Reinkultur sondern ausschließlich nur zusammen mit *Ignococcus* kultiviert werden.

Vertreter der Gattung *Nanoarchaeum* wurden in jüngster Zeit noch aus anderen hyperthermophilen Habitaten mit Temperaturen um 90 °C isoliert, z.B. aus Hydrothermalsystemen im Meer sowie aus heißen Quellen. Eine einzige bekannte Spezies ist jedoch *Nanoarchaeota equitans* mit einer Größe von 0,4 µm (WATERS ET AL. 2003).

## **2.2 Methoden der mikrobiellen Taxonomie**

Die Taxonomie bzw. die Klassifizierung von Mikroorganismen basiert auf zwei Disziplinen, der Identifizierung und der Nomenklatur. Traditionelle Grundlage der Taxonomie ist die Untersuchung von phänotypischen Merkmalen, also charakteristischen Eigenschaften der Morphologie und der Physiologie.

Lange Zeit wurde eine taxonomische Klassifizierung von Mikroorganismen nur basierend auf solchen morphologischen und physiologischen Merkmalen durchgeführt. Aber mit der wachsenden Zahl neuisolierter Mikroorganismen wurden die Mikrobiologen zunehmend mit dem Problem der Identifizierung konfrontiert (WOESE, 1987). Die An-

wendung molekularbiologischer Methoden ermöglichte die Ergänzung der ausschließlich phänotypischen Identifizierung durch eine genotypische Charakterisierung.

Basierend auf einer Vielzahl phänotypischer und genotypischer Merkmale mehrerer verschiedener Organismen kann mittels verschiedener mathematischer Methoden deren evolutionäre Verwandtschaft ermittelt werden. Eine solche phylogenetische Analyse ermöglicht außerdem die Einordnung unbekannter Organismen in bestehende taxonomische Gruppen, in dem diese in Beziehung zu bekannten (Referenz-) Organismen gesetzt werden.

Die derzeit gültige und sogleich die wichtigste taxonomische Klassifikation von Bacteria und Archaea ist beschrieben im *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garriety et al. 2004).

## 2.2.1 Phänotypische Charakterisierung

### 2.2.1.1 Charakterisierung der Morphologie

#### *Mikroskopische Verfahren*

Bei Prokaryoten kann man verschiedene Zellformen finden, wie Kokken, Stäbchen, Spirillen oder filamentöse Formen. Prokaryotische Mikroorganismen können viele unterschiedliche Größen aufweisen, die von 0,4 µm bis zu 750 µm variieren können. Um die Zellen der Mikroorganismen und ihre innere Struktur sichtbar zu machen, werden entweder lichtmikroskopische oder elektronenmikroskopische Verfahren benutzt.

#### *Zellfärbungen*

Mikroskopische Verfahren können durch Färbeverfahren, welche bestimmte zelluläre Strukturen sichtbar machen, unterstützt werden. In der mikrobiellen Taxonomie ist die Gram-Färbung mit Kristallviolett-Jod sehr wichtig. Bei den grampositiven Bakterien wird durch den vielschichtigen, dickeren Peptidoglycan-Sacculus der Kristallviolett-Jod-Komplex besser in der Zelle zurückgehalten als bei den gramnegativen Bakterien mit ihrer vergleichsweise dünnen Peptidoglycanschicht. Grampositive Bakterien bleiben bei der Differenzierung daher dunkelviolett. Gramnegative werden entfärbt, sie werden bei einer anschließenden Gegenfärbung mit Fuchsin rot gefärbt. Damit kann man Bakterien mit Hilfe der Gram-Färbung grundsätzlich in zwei große Gruppen einteilen, die sich anhand der Zellwandstruktur voneinander unterscheiden.

### *Fettsäureanalyse (FAME)*

Eine ebenfalls weit verbreitete Methode zur Identifikation ist die Analyse von Fettsäuren in der Cytoplasmamembran und den zellulären Membranen. Diese Analyse erfolgt durch die Hydrolyse einer Reinkultur verbunden mit einer chemischen Derivatisierung der Membranlipide. Anschließend werden die Säuregruppen der Fettsäuren methyliert. Die resultierenden Methylester können durch eine Gaschromatographie getrennt werden. Das Muster der Fettsäuremethylester (engl. *fatty acid methyl esters*, Abk. FAME) bzw. deren Chromatogram wird dann mit den in einer Datenbank hinterlegten FAME-Mustern von Referenz-Arten verglichen.

Die Fettsäureanalyse ist ein Standardverfahren in der klinischen und medizinischen Analytik sowie in der Nahrungsmittel-Produktion. Sie wird ebenfalls in der ökologischen Forschung benutzt, um bestimmte Bakterien in Umweltproben nachzuweisen (WIITE ET AL. 1998; HEDRICK ET AL. 2000).

### 2.2.1.2 Charakterisierung der Physiologie

Die Physiologie von Mikroorganismen lässt sich am einfachsten anhand ihrer Stoffwechselleistungen ermitteln. Hierzu werden die Mikroorganismen bestimmten Kulturbedingungen ausgesetzt, unter denen sie entweder wachsen können oder absterben.

#### *Anaerobes und aerobes Wachstum*

Im Gegensatz zu Eukaryoten sind viele Prokaryoten zum Wachstum unter anaeroben Bedingungen fähig. Hierbei können je nach Art verschiedene Substrate verstoffwechselt werden.

#### *Temperatur*

Mikroorganismen lassen sich auch nach der Temperatur, bei der sie optimales Wachstum zeigen, klassifizieren. Psychrophile Mikroorganismen wachsen bei niedrigen Temperaturen zwischen -10 °C bis 20 °C, mesophile Mikroorganismen bei mittleren Temperaturen von 25 °C bis 45 °C, thermophile Mikroorganismen bei Temperaturen über 45 °C. Hyperthermophile Mikroorganismen sind in der Lage, bei extrem hohen Temperaturen weit über 100 °C zu überleben und teilweise auch zu wachsen.

### *Substratverwertung*

Im Labor züchtet man Mikroorganismen auf zwei verschiedene Arten von Kulturmedien, entweder auf chemisch definierten Medien oder auf komplexen Medien.

Chemisch definierte Medien sind Medien, in denen die genaue chemische Zusammensetzung bekannt ist. Komplexe Medien hingegen bestehen aus undefinierten Abbauprodukten von tierischen oder pflanzlichen Ausgangsstoffen, wie z.B. aus Aufschlüssen von Casein, Rindfleisch, Sojabohnen oder Hefen.

In der analytischen Mikrobiologie werden Kulturmedien oft selektiv oder differenziell verwendet. Die selektiven Medien inhibieren das Wachstum von einigen Mikroorganismen, aber nicht von anderen, welche dann in dieser Kultur angereichert werden. Zusätzlich können bestimmte Farbstoffe (Indikatoren) benutzt werden, um bestimmte chemische Reaktionen zu erkennen, die während des Wachstums ablaufen. Ein Beispiel hierfür ist die Änderung des pH-Wertes durch Säurebildung während der Gärungsprozesse.

### 2.2.2 Genotypische Charakterisierung

Die Ausprägung von morphologischen und physiologischen Merkmalen resultiert aus der genetischen Anlage verbunden mit einer umweltbedingten Variation. Der Einfluss der Umwelt auf die Merkmalsausbildung ist *a priori* nicht abschätzbar und kann extrem variabel ausfallen. Die taxonomische Einordnung von Organismen anhand von Merkmalen mit hoher Umweltvarianz ist daher äußerst problematisch.

Die genetische Information eines beliebigen Organismus unterliegt dagegen keinerlei Umweltvarianz. Mit jüngsten technischen Entwicklungen lässt sich die gesamte genetische Information eines Organismus innerhalb weniger Wochen komplett und statistisch abgesichert bestimmen (MARGULIES ET AL. 2005). Zur taxonomischen Einordnung reicht jedoch die Erfassung einzelner standardisierter und universeller Genstrukturen wie z.B. die Sequenzierung der Gene für die ribosomale RNA, die direkte Analyse der ribosomalen RNA oder die Verwendung von gruppenspezifischen DNA-Sonden zum Nachweis von bestimmten DNA-Strukturen in der genomischen DNA oder in DNA-Transkripten.



### 2.2.2.1 Struktur der Ribosomen und Ribotyping

#### *Ribosomen*

Eine prokaryotische Zelle hat etwa 20000 Ribosomen, die fast ein Drittel der gesamten Zellmasse ausmachen. Das Ribosom ist der Ort der zellulären Proteinbiosynthese.

Die Größe der Ribosomen und die ihrer Untereinheiten wird durch ihr Sedimentationsverhalten während der Ultrazentrifugation im Dichtegradienten charakterisiert, das in Svedberg-Einheiten (Abk. S) angegeben wird.

Die Ribosomen sind aus zwei verschieden großen Untereinheiten aufgebaut. Die grosse Untereinheit sedimentiert mit 50S und die kleine mit 30S. Jede Untereinheit setzt sich aus Protein- und Ribonukleinsäure- (RNA-) Anteilen zusammen.

Die große 50S Untereinheit besteht aus zwei rRNA-Typen, einer 23S rRNA aus ca. 2900 Nukleotiden und einer 5S rRNA aus ca. 120 Nukleotiden sowie 33 Strukturproteinen.

Die kleine Untereinheit 30S des bakteriellen Ribosom ist aus der 16S rRNA mit 1542 Nucleotiden und 21 verschiedenen Proteinen aufgebaut.

Die molekularbiologischen Methoden zur Analyse von komplexen mikrobiellen Biozöosen basieren auf Unterschieden in der Nukleinsäuresequenz. Die Zielstrukturen dieser Analysen sind meist die 16S oder 23S rRNA bzw. rDNA. Die 16S rRNA ist in der kleinen Untereinheit und die 23S rRNA in der großen Untereinheit der Ribosomen aller prokaryotischen Organismen lokalisiert. Aufgrund der einheitlichen Funktion der Ribosomen in der Proteinbiosynthese ist die Sequenz der 16S rRNA bzw. 23S rRNA und der entsprechenden Gene in manchen Bereichen stark konserviert. In den variablen Bereichen sind die Sequenzunterschiede umso größer, je geringer die phylogenetische Verwandtschaft zweier Organismen ist. Daher sind diese variablen Bereiche besonders für phylogenetische Untersuchungen geeignet.

#### *Ribotyping*

Das *ribotyping*-Verfahren ist eine DNA-Fingerabdruck-Methode, welche basierend auf der 16S rDNA und der 23S rDNA eine Identifizierung von unbekannter bakterieller DNA ermöglicht. Hierbei wird das genetische Verhältnis zwischen dem unbekannten Mikroorganismus und bekannten Referenz-Organismen bestimmt (GRIMONT & GRIMONT. 1986, STULL ET AL. 1988, GRAVES ET AL. 1991).

Beim *ribotyping* wird nicht mit einer direkten DNA-Sequenzierung gearbeitet, sondern die ribosomale RNA eines Organismus wird durch ein Enzym, eine Restriktionsendonuklease, an definierten Nukleotidsequenz-Mustern geschnitten. Danach werden die Fragmente in einer Gelelektrophorese getrennt und mit einer DNA-Sonde nachgewiesen.

Diese Methode ist so spezifisch, weil jede Art ein einzigartiges Fragmentmuster besitzt, so dass man diese Technik auch als molekularer Fingerabdruck bezeichnen kann. In der Praxis wird das *ribotyping*-Verfahren mit DNA aus einer Kolonie oder Reinkultur durchgeführt. Die Muster der DNA-Fragmente können digitalisiert werden. Anschließend erfolgt ein computergestützter Vergleich dieser Muster mit anderen Mustern von Referenzorganismen z.B. aus einer Datenbank.

In der Zusammenfassung ist das *ribotyping*-Verfahren eine sehr spezifische und schnelle Methode zur bakteriellen Identifizierung, weswegen diese Technik häufig in der klinischen Diagnostik eingesetzt wird (STULL ET AL. 1988; OLSEN ET AL. 1992; POPOVIC ET AL. 1993). Auch in der Abwasserreinigung haben KUNTZ ET AL. (2003) die *ribotyping*-Methode zum Nachweis von kontaminierenden Bakterien in einem amerikanischen Fluss benutzt.

#### 2.2.2.2 Nukleinsäure-Hybridisierung

Eine denaturierte DNA (d.h. einzelsträngige DNA) kann verwendet werden, um Hybride mit anderen einzelsträngigen DNA- (oder RNA-) Molekülen zu bilden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Anwesenheit gleichsinniger (komplementärer) Nukleotidsequenzen. Solche analytischen DNA-Moleküle werden als Sonden (engl. *probe*) bezeichnet, die komplementären DNA-Moleküle werden Ziel-DNA (engl. *target*) genannt.

Mit bekannten DNA-Sonden können ähnliche DNA-Sequenzen in dem Genom bei unterschiedlichen Mikroorganismen detektiert werden. Durch ein Set verschiedener DNA-Sonden können genetische Distanzen (Sonde hybridisiert bzw. hybridisiert nicht) ermittelt werden. Wie beim *ribotyping* findet hierbei keine direkte Ermittlung von Gensequenzen statt.

#### 2.2.2.3 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wird in erster Linie zur Bestimmung der mikrobiellen Diversität eingesetzt. Im Unterschied zu dem *ribotyping*-Verfahren oder

der DNA-Hybridisierung untersucht diese Technik die Nukleinsäuresequenz einer Zelle, ohne dabei deren Morphologie oder die Integrität der Zellkompartimente zu verändern. Erstmals beschrieben wurde diese Methode von PARDUE & GALL sowie von JOHN ET AL. 1969.

Die auf Gensondentechnik basierende Methode der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) ist eine kultivierungsunabhängige Methode, bei der phylogenetische Bakterien-gruppen mittels 16S oder 23S rDNA-Oligonukleotidsonden nachgewiesen werden. Durch Fluoreszenzmarkierung der Sonden können die einzelnen Zellen der Zielorganismen unter dem Mikroskop identifiziert und quantifiziert werden (AMANN ET AL. 1995).

Eine hohe Kopienzahl der 16S bzw. 23S rRNA liegt nur in intakten, stoffwechselaktiven Zellen vor. Diese hohe Kopienzahl ist Voraussetzung für ein deutliches Fluoreszenzsignal bei Verwendung einfach markierter Sonden. Die Test-Sonde ist markiert durch enzymatische Inkorporation von Biotin- oder Digoxigenin-markierten Nukleotiden. Daneben gibt es auch mit Fluoreszenz-Farbstoffen markierte Sonden. Bei der FISH erfolgt die Hybridisierung nicht an isolierten DNA-Molekülen, sondern *in situ* im biologischen Präparat, wo die Ziel-DNA noch in den Zellen vorliegt.

Durch neue DNA-Technologien können unterschiedlichste DNA-Fragmente von verschiedenen Ursprungsorganismen in kurzer Zeit kloniert werden und so als Sonde eingesetzt werden. Eine Vielzahl solcher DNA-Fragmente für den Nachweis vieler mikrobieller Gruppen sind vorhanden und bereits für eine Verwendung als FISH-Sonde optimiert. Mittels FISH-Analyse wurden Untersuchungen der mikrobiellen Diversität in Belebtschlamm verschiedener methanogener Reaktoren in Abwasserreinigungsprozessen durchgeführt (SEKIGUCHI ET AL. 2001, TANG ET AL. 2005).

#### 2.2.2.4 Sequenzanalyse der RNA oder DNA

Unter einer DNA- oder RNA-Sequenzierung versteht man die Bestimmung der DNA- oder RNA-Nukleotidsequenz in einem DNA-Molekül. Während die DNA von einem bekannten Startpunkt aus direkt sequenziert werden kann, müssen RNA-Moleküle (z.B. ribosomale RNA) vor der Sequenzierung durch eine enzymatische Reaktion in die komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Bei Kenntnis der genauen Nukleotidabfolge ausgewählter DNA-Segmente kann diese mit den Nukleotidsequenzen von Referenzarten in Beziehung gesetzt werden und so die genetische Distanz zwischen

den Organismen ermittelt werden (SANGER & COULSON. 1975; SANGER ET AL. 1977; MAXAM & GILBERT. 1977).

#### 2.2.2.5 Analyse anderer Gene

Die Energiegewinnung der methanogenen Archaea verläuft über den Stoffwechselweg der Methanogenese. Das Schlüsselenzym der Methanogenese ist die Methyl-Coenzym-M-Reduktase (MCR), welche den letzten Schritt der Methansynthese katalysiert, bei dem ein S-Methyl-Coenzym-M-Komplex zu Methan und Coenzym-M reduziert wird.

Dieses Enzym setzt sich aus verschiedenen Untereinheiten (Alpha-, Beta-, Gamma-Untereinheit) zusammen. Die *mcrA*-Gene (Methyl-Coenzym-M Reduktase Untereinheit Alpha) werden neben der Analyse der 16S rDNA Sequenz ebenfalls für eine taxonomische Untersuchung der methanogenen Archaea verwendet (LUEDERS ET AL. 2001; LUTON ET AL. 2002).

#### 2.2.2.6 Analyse des gesamten Genoms

##### *Genomprojekte*

Das Genom beschreibt die gesamte genetische Ausstattung eines Lebewesens. Die Genom-Sequenzierung liefert somit nicht nur die genetische Information eines Lebewesens, sondern definiert auch dessen Stoffwechsel, Funktion und seine Evolutionsgeschichte.

1976 war die erste vollständige Sequenzierung eines (RNA-) Genoms, nämlich die des Virus MS2, mit einer Größe von 3569 Nukleotiden abgeschlossen (FIERS ET AL. 1976). Bis zum Jahr 2000 wurden die 3 Milliarden Basenpaare des haploiden Genoms des Menschen untersucht. Zur Zeit sind die vollständigen Genome von einigen hundert Arten ermittelt und viele sind in Bearbeitung. (GLÖCKNER ET AL. 2003; VENTER ET AL. 2004; SCHLESNER ET AL. 2004; DE LONG ET AL. 2005).

### 2.2.3 Bioinformatische Ressourcen

#### 2.2.3.1 *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)

Die weltweit größte Sammlung für DNA-Sequenzen befindet sich am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) und ist via Internet<sup>1</sup> frei und unentgeltlich verfügbar. NCBI wurde 1988 als Zentrales Institut für Datenverarbeitung und Datenspeicherung in der Molekularbiologie gegründet wurde. Neben der DNA-Sequenzsammlung (GenBank) stellt NCBI dem Anwender auch eine Datenbank mit wissenschaftlicher Literatur (PubMed) sowie diverse Standardsoftware der Bioinformatik zur Verfügung. Es ermöglicht so umfangreiches Suchen und bietet eine ganze Reihe von Tools zur Datenanalyse und für spezielle Suchoperationen (BENSON ET AL. 2006).

Der Vergleich von DNA-Sequenzen mit in der GenBank gespeicherten Sequenzen lässt sich einfach mit dem Softwarepaket BLAST<sup>2</sup> (*basic local alignment search tool*) verwirklichen. BLAST ist für eine Sammlung der weltweit am meisten genutzten Programme zur Analyse biologischer Sequenzdaten und wurde in der ersten Version 1990 von ALTSCHUL ET AL. programmiert. BLAST wird dazu verwendet, experimentell ermittelte DNA- (BLASTN) oder Protein-Sequenzen (BLASTP) mit bereits in einer Datenbank vorhandenen Sequenzen zu vergleichen.

#### 2.2.3.2 Das Ribosomal Database Project (RDP)

Speziell zur Analyse der ribosomalen Sequenzen wurde das *Ribosomal Database Project*<sup>3</sup> eingerichtet (HARMSSEN ET AL. 2004). Dieses verfügt über eine online-Datenanalyse, Softwarelösungen zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen sowie Software zum Alignment von rRNA Sequenzen. Im Unterschied zu der NCBI GenBank enthält die RDP-Datenbank ausschließlich rDNA-Sequenzen und ist für die Durchführung von taxonomischen Analysen optimiert.

#### 2.2.3.3 Programme für den Vergleich von Nukleotidsequenzen: Clustal

Das Softwareprogramm Clustal<sup>4</sup> ist ein universell einsetzbares Computerprogramm zur Ausrichtung von DNA- oder Protein-Sequenzen (Alignment). Mit dem ClustalW-Algorithmus können schnell und einfach Sequenzvergleiche durchgeführt werden. Die-

---

<sup>1</sup> [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/)

<sup>2</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>

<sup>3</sup> <http://www.cme.msu.edu/RDP>

<sup>4</sup> <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

se *open source* Software ist sehr häufig in vielen anderen phylogenetischen Programmpaketen wie z.B. MEGA integriert (CHENNA ET AL. 2003).

#### 2.2.3.4 Programme für phylogenetische Analysen: MEGA

Das Softwarepaket MEGA<sup>1</sup> ist ein Programm für die Analyse von phylogenetischen Relationen zwischen verschiedenen Organismen basierend auf der Analyse von DNA- und Proteinsequenzen (KUMAR ET AL. 2003).

MEGA enthält Programme zur Ausrichtung von Sequenzen (ClustalW) sowie zur Ermittlung der paarweisen und gesamten Distanz. Weiterhin kann die phylogenetische Relation mittels einer Clusteranalyse grafisch als phylogenetischer Baum dargestellt werden.

MEGA bietet verschiedene statistische Verfahren zur Durchführung von phylogenetischen Analysen, die vom Anwender frei kombiniert werden können. Im Folgenden soll eine kurze Übersicht über die wichtigsten dieser Verfahren gegeben werden.

Der **Neighbour-Joining-Algorithmus** ist ein mathematisches Verfahren, um Datensätze zu vergleichen und anzuordnen. Dieses Verfahren wurde 1987 von SAITOU & NEI vorgestellt und 1988 von STUDIER & KEPPLER verbessert. Dieses Verfahren wird zur Erstellung von phylogenetischen Baumstrukturen verwendet. Hiermit soll anhand von variierenden Merkmalen in der Datenmatrix die Wahrscheinlichkeit einer Abstammungs- oder Verwandtschafts-Beziehung in einer stammbaumartigen Darstellung berechnet werden. Der Algorithmus benötigt Wissen über die Distanz zwischen zwei Paaren von Taxa (Arten oder Sequenzen) in einem Baum.

Die **Jukes-Cantor-Korrektion** wird verwendet, um die Distanzdaten, die aus einem Sequenzalignment stammen, zu korrigieren. Hierbei wird jede Position in der Nukleotid-Reihenfolge der DNA eine gleiche Wahrscheinlichkeit von Mutationen zugewiesen (FELSENSTEIN 1985).

Zur statistischen Absicherung von den ermittelten phylogenetischen Relationen wird häufig eine Bootstrap-Analyse durchgeführt. Anhand einer Vielzahl von wiederholten Clusterberechnungen basierend auf partiellen Datensätzen kann so ein Wert für die statistische Sicherheit der phylogenetischen Gruppen ermittelt werden (GARRITY ET AL 2001).

---

<sup>1</sup> <http://www.megasoftware.net>

## 2.3 Molekulargenetische Verfahren zur Analyse komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften

Häufig verwendete molekularbiologische Methoden zur Erfassung der bakteriellen Diversität und Zusammensetzung von Umwelthabitaten sind die Erstellung von Genbanken in Kombination der *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA), die denaturierende Gradientengelelektrophorese (DGGE), die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (RFLP) und die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH).

### 2.3.1 Anlage einer 16S rDNA Bank

Die Charakterisierung der mikrobiellen Artenvielfalt erfolgt mittels einer Analyse der Sequenzunterschiede innerhalb der 16S rDNA (taxonomischer Standard). Aus der gereinigten DNA wird ein Bereich der 16S rDNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) selektiv vervielfältigt. Die PCR-Produkte werden in ein Plasmid ligiert und das Konstrukt in *E. coli* transformiert (16S rDNA Bibliothek).

### 2.3.2 ARDRA (Restriktionsanalyse der amplifizierten 16S rDNA)

Die Diversität der 16S rDNA Sequenzen innerhalb einer DNA-Bibliothek wird mittels *fingerprint*-Analyse (ARDRA) ermittelt. Jeder individuelle *fingerprint* repräsentiert eine bestimmte Art bzw. Gruppe innerhalb der Biogasreaktorprobe. Nach der Sequenzierung der entsprechenden 16S rDNA und deren Vergleich mit Genbank-Sequenzen kann eine phylogenetische Einordnung durchgeführt werden.

Die zu analysierende DNA-Sequenz wird mit Restriktionsenzymen geschnitten. Die Polymorphismen in den Restriktionsschnittstellen zwischen verschiedenen Arten bewirken unterschiedliche Fragmentlängen, welche elektrophoretisch detektiert werden können.

Nach einem visuellen Vergleich der ARDRA-Muster werden repräsentative Klone für jedes individuelle ARDRA-Muster ausgewählt und deren 16S-rDNA-Insert sequenziert. Die Sequenzen werden als operative taxonomische Einheiten (*operational taxonomic units*, OTU) verwendet. OTU ist ein neutraler und unverbindlicher Begriff für Taxa in einer phylogenetischen Analyse, unter Umgehung der Unterscheidung von Art, Population oder Individuum.

Die ARDRA-Technik wurde bereits erfolgreich zur Analyse der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in methanogenen Reaktoren (CSTR, Abwasserreaktoren) eingesetzt. Beispiele hierfür sind die Arbeiten von FERNANDEZ ET AL. (1999) und KLOCKE ET AL. (2007).

### 2.3.3 Environmental Genomics

Die Möglichkeit mikrobielle Genome vollständig zu sequenzieren hat in den letzten Jahren neue Wege zum Verständnis der Diversität und Funktion von Mikroorganismen in einer Vielzahl von Umwelten eröffnet. Das Ziel der mikrobiellen Genomforschung ist es, durch die Untersuchung des genetischen Potenzials von Mikroorganismen mehr über die Mechanismen herauszufinden, die es den Organismen erlauben, sich an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen.

Das Potential von molekularbiologischen Methoden, wie die von C. VENTER mit der Sequenzierung des humanen Genoms eingeführte Methode des *whole genome shotgun sequencing*, werden eindrucksvoll durch das ebenfalls von VENTER ET AL. 2004 durchgeführte Metagenomik-Projekt zur Analyse der gesamten mikrobiellen Diversität der Sargasso-See aufgezeigt. Hier bei soll in einem Gebiet in der Nähe des Bermudadreiecks ausschließlich durch die zufällige Sequenzierung der gesamten DNA in einer Meerwasserprobe eine Inventarisierung aller Kleinstlebewesen durchgeführt werden. Das Sargossa-See-Projekt lieferte den öffentlichen Datenbanken mehr als 1,6 Gbp (= 1.600.000.000 Basenpaare) in 1.045.970 individuellen Einträgen an DNA-Sequenzen (VENTER ET AL. 2004).

Der Vorteil der direkten Sequenzierung von DNA aus Umweltproben ist, dass keine vorherige Kultivierung der Mikroorganismen benötigt wird. Da ein großer Teil der natürlichen mikrobiellen Diversität mit klassischen Kultivierungsmethoden kaum oder schwerzugänglich ist, stellt die kultivierungsunabhängige Analyse der mikrobiellen DNA die einzige Vorgehensweise zur vollständigen Inventarisierung der Arten dar.

## 2.4 Anaerober Abbau von organischen Substanzen

Der Abbau von organischen Substanzen unter anaeroben Bedingungen (Gärung) ist ein grundlegender Prozess zur Energiegewinnung. Hierbei erfolgt die Bildung des universalen zellulären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) durch eine Substratkettenphosphorylierung. Während bei der Atmung unter aeroben Bedingungen die in dem



Prozess reduzierten Coenzyme (z.B. NADH) durch Übertragung der Elektronen auf Sauerstoff reoxidiert und damit recycelt werden können, ist unter anaeroben Bedingungen die Gärung der einzige Weg zur Reoxidation der reduzierten Coenzyme.

Gärenden Organismen fehlt die Fähigkeit, durch die Übertragung von Elektronen auf einen externen Elektronenakzeptor für den Stoffwechsel nutzbare Energie zu erzeugen. Im Laufe der Evolution haben sich verschiedene Gärungstypen gebildet, die sich im Wesentlichen durch die Art der Metabolisierung von Pyruvat unterscheiden. Pyruvat ist das zentrale Intermediat der Gärungsstoffwechsel und wird durch die Glykolyse oder alternative Stoffwechselwege gebildet. Neben Kohlenhydraten können auch Fettsäuren, Aminosäuren und einige aromatische Verbindungen vergoren werden, wobei der Abbau oft von speziellen fermentativen Bacteria durchgeführt wird.

Gärungen werden auf der Grundlage der fermentierten Substrate Polysaccharide, Polypeptide und Fette bzw. der gebildeten Endprodukte eingeteilt. Die wichtigsten Typen sind die alkoholische-, die Milchsäure-, die Propionsäure-, die Buttersäure-, die gemischte Säure- und die Essigsäuregärung.

Die Gärung ist zentraler Bestandteil des anaeroben Abbaus von Biomasse (Abb. 3).

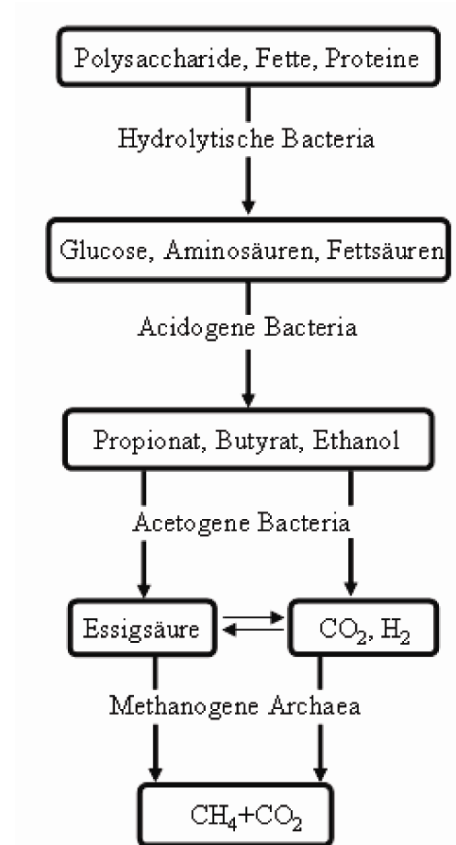


Abb. 3: Der Abbauprozess von organischen Verbindungen unter anaeroben Bedingungen

Der Gärung vorausgehen kann eine Monomerisierung von langkettigen Biomolekülen durch hydrolytische Bakterien. Nachfolgend kann eine Verwertung der Endprodukte der Gärung durch methanogene Archaea erfolgen.

#### 2.4.1 Hydrolyse

In diesem ersten Abbauschritt werden die Biopolymere (Polysaccharide, Polypeptide und Fette) durch hydrolytische Bakterien in Monomere und Oligomere (Zucker, Aminosäuren, Oligopeptide, langkettige Fettsäuren, Glyceride) zerlegt. Die notwendigen Enzyme (Hydrolasen) werden durch die Bakterien sekretiert. Der Prozess erfolgt also extrazellulär.

#### 2.4.2 Acidogenese

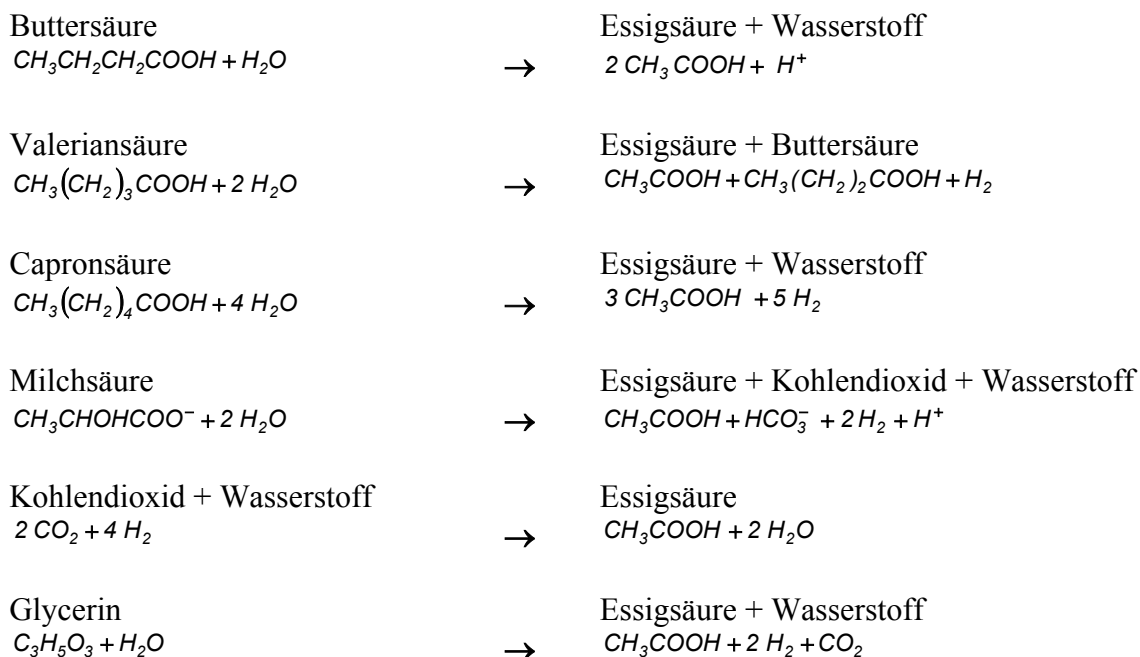
Die Monomere und Oligomere aus der Hydrolyse werden in Acidogenese, also der Säurebildung im Zuge der Gärung, durch fermentative Bakterien (z.B. Clostridien) weiter abgebaut. Die dabei entstehenden Produkte bestehen hauptsächlich aus Carboxylsäuren wie Essigsäure, Buttersäure und Propionsäure. Parallel werden auch andere Produkte wie kurzkettige Alkohole, Milchsäure, Wasserstoff und Kohlendioxid gebildet. Bei diesem Umsetzungsschritt verzeichnen die fakultativ anaeroben Mikroorganismen erstmals einen Energiegewinn, und es werden bei dieser Umsetzung bereits bis zu 20 % des Gesamtanteils an Essigsäure gebildet.

#### 2.4.3 Acetogenese

Die acetogenen Bakterien stellen ein wichtiges Bindeglied zwischen Gärung und Methanbildung dar. Hierbei werden Propionsäure, Buttersäure und kurzkettige Alkohole zu Essigsäure, Kohlendioxid und Wasserstoff abgebaut. Essigsäure und Wasserstoff wiederum sind Substrate für methanogene Archaea.

Die Einzelreaktionen der Stoffwechselreaktionen während der acidogenen Stufe werden nachfolgend zusammengefasst:

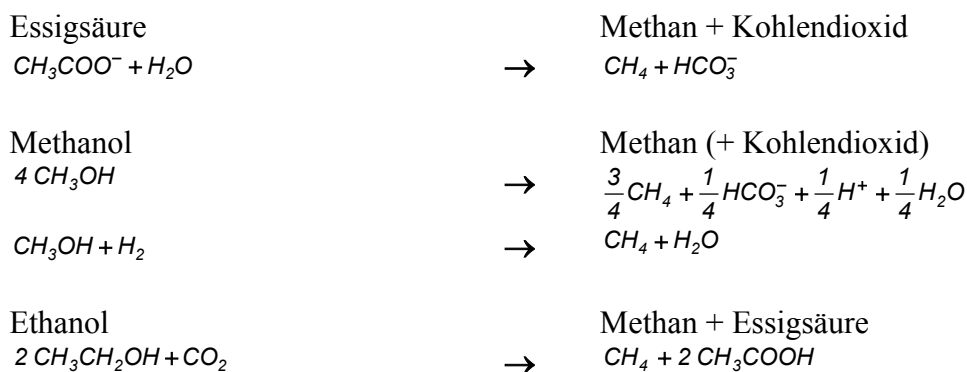




#### 2.4.4 Methanogenese

Die Methanogenese ist eine anaerobe Bildung von Methan durch bestimmte (methanogene) Archaea unter Energiegewinn. In dieser obligat anaerob ablaufenden Phase wird Essigsäure, die während der Acidogenese und Acetogenese gebildet wurde, durch acetogenotrophe Archaea in Methan ( $CH_4$ ) und Kohlendioxid ( $CO_2$ ) sowie Kohlendioxid ( $CO_2$ ) und Wasserstoff ( $H_2$ ) durch hydrogenotrophe Methanbildner in Methan und Wasserstoff umgewandelt.

Die wichtigste chemische Reaktion der Archaea werden nachfolgend dargestellt:



#### 2.4.5 Mikrobiologie der Fermentation

Die Fermentation wird in erster Linie durch Bacteria durchgeführt. Die meisten fermentativen Bacteria sind in der Gattung *Clostridium* zu finden. Die einzelnen Arten der Gattung *Clostridium* werden in erster Linie anhand der chemischen Natur der vergorenen Substrate bzw. der Endprodukte der Gärung unterschieden.

Eine Reihe von *Clostridium*-Arten sind in der Lage, Zucker, Stärke und Pektin zu vergären. Als Beispiele hierfür seien *C. thermocellum* und *C. butyricum* genannt. Diese Arten erzeugen als Endprodukte der Gärung Aceton, Butanol, Ethanol, Buttersäure, Essigsäure, Propionsäure, Succinylsäure, Kohlensäure und Wasserstoff. Einige Clostridien des Aceton/Butanol-Typs, wie z.B. *C. pasteurianum*, können zusätzlich Stickstoff fixieren. (LEMEE ET AL. 2004).

Eine andere Gruppe der Clostridien bezieht ihre Energie aus der Vergärung von Aminosäuren. Beispielhaft für diese Gruppe ist *C. sporogenes*. *C. sporogenes* katabolisiert eine Mischung der Aminosäuren Glycin und Alanin. Endprodukte der Gärung von *C. sporogenes* sind Essigsäure, Fettsäure, Ammoniak, Kohlendioxid und, unter bestimmten Bedingungen, auch manchmal Wasserstoff (DUPUY ET AL. 2005)

Manche Arten wie z.B. *C. cellobioparuma* vergären Cellulose und erzeugen als Gärungsprodukte Acetat, Lactat, Succinat, Ethanol, Kohlendioxid und Wasserstoff. Die Art *C. kluyveri* wiederum nutzt Ethanol als Substrat für die Gärung und bildet hieraus Buttersäure, Capronsäure und Wasserstoff. (WOESE ET AL. 1991; ROHDICH ET AL. 2001).

Syntrophie ist eine Situation, in der zwei unabhängige und unterscheidbare Organismen eine Substanz abbauen und daraus Energie gewinnen, wo keiner der beteiligten Organismen alleine in der Lage wäre, diese Abbauleistung allein zu vollbringen.

Vertreter der obligat syntrophen Mikroorganismen, die man auch die sekundären fermentativen Bacteria nennt, sind z.B. *Syntrophobacter wolinii*, *Syntrophomonas wolfei*, *Syntrophospora bryantii* und *Syntrophus buswelii*. Diese Mikroorganismen nutzen die von anderen fermentativen Bacteria erzeugten Fettsäuren für ihren Katabolismus. Endprodukt dieser Organismen ist meistens Wasserstoff und Kohlenstoff (ZEHNDER & WUHRMANN 1977).

Für die Biogas-Bildung von Bedeutung sind alle diese Gruppen fermentativer Bacteria. Sie spielen eine große Rolle vor allem in den Prozessen der Hydrogenese und der Acidogenese und sind daher häufig und in großer Menge in Biogas-Reaktoren vertreten. Dominierende Arten der Fermentation sind in anaeroben Laborreaktoren *C. indolis*, *C.*

*paraputrificum* und *C. butyricum* (DELBES ET AL. 2001). In mesophilen Reaktoren mit Belebtschlamm sind *C. cellulosi*, *C. acetobutyricum* und *C. tyrobutyricum* als dominierende Arten nachgewiesen worden (FANG ET AL. 2002).

#### 2.4.6 Sulfatreduktion als konkurrierender Prozess zur Fermentation und Methanogenese

Unter anaeroben Bedingungen können Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) und elementarer Schwefel (S) als finale Elektronenakzeptoren im Rahmen des Stoffwechsels einer großen Gruppe von Delta-Proteobacteria dienen, vorrangig in Verbindung mit Wasserstoff als Elektronendonator.

Häufige Vertreter in anaeroben Milieus dieser Gruppe sind *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum* und *Desulfobulbus*, welche als Elektronendonoren Lactat, Pyruvat, Ethanol oder bestimmte Fettsäuren verwerten. Dabei wird Sulfat zu Schwefelwasserstoff reduziert. Andere Gattungen, wie *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* und *Desulfonema* sind auf die Oxidation von Fettsäuren, insbesondere Acetat spezialisiert. Dabei wird Sulfat ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) zu Sulfid ( $\text{S}^{2-}$ ) reduziert.

Die sulfatreduzierenden Bacteria sind Bestandteil des anaeroben Abbauprozesses von Biomasse. Natürliche Lebensräume sind vorrangig aquatische Habitate, wie anoxische Süßwasser, aber auch anoxische terrestrische Ökosysteme oder der Darmtrakt von Säugetieren.

In technischen Systemen zur Bildung von Biogas und hierbei besonders in Reaktoren zur anaeroben Verwertung von Klärschlamm wurden eine große Anzahl von verschiedenen sulfatreduzierenden Bacteria gefunden. Dominante Arten waren hierbei *Desulfococcus multivorans*, *Desulfosarcina variabilis* und *Desulfobotulus sapovorans* (RASKIN ET AL. 1995). Speziell als Bestandteil von mikrobiellen Lebensgemeinschaften auf Oberflächen, so genannten Biofilmen, wurden in anaeroben Reaktoren die Arten *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfobacter latus* und *Desulfobulbus propionicus* nachgewiesen (RASKIN ET AL. 1996).

#### 2.4.7 Mikrobiologie der Methanogenese

Methan kann ausschließlich von Archaea gebildet werden, methanogene Bacteria sind nicht bekannt. Innerhalb der Archaea ist die Fähigkeit zu Methanbildung auf die Euryarchaeota beschränkt.

Methanogene Archaea finden sich in fünf verschiedenen Ordnungen, welche sich eindeutig u.a. anhand der Nukleotidsequenz der 16S rDNA unterscheiden lassen: Methanobacteriales, Methanococcales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales und Methanopyrales. Zu der letzteren Ordnung zählen ausschließlich extremophile Mikroorganismen. Bislang nicht taxonomisch eingeordnet sind zwei neue Gruppen, welche in dieser Arbeit entsprechend der Erstautoren als CA-11-Gruppe (GODON ET AL. 1997) bzw. als ARC-I-Gruppe (CHOUARI ET AL. 2005) bezeichnet werden.

In der Ordnung Methanobacteriales sind bislang zwei Arten beschrieben: *Methanobacterium thermoformicicum* und *Methanobacterium bryantii*. Beide Arten zählen zu den hydrogenotrophen Arten, welche sich regelmäßig in Abwasser finden lassen (SEKIGUCHI ET AL. 1998; RASKIN ET AL. 1996).

Ebenfalls aus Abwasserproben isolierten 1995 RASKIN ET AL. erstmals Vertreter der Ordnung Methanococcales. Methanococcales sind wie die Methanobacteriales ebenfalls  $H_2$  und  $CO_2$  verwertende Spezies.

In der Ordnung Methanomicrobiales werden die Gattungen *Methanoculleus* und *Methanospirillum* zusammengefasst. Diese hydrogenotrophen Arten wurden aus dem Schlamm eines Reisfeldes isoliert (WU ET AL. 2006).

Vertreter der Ordnung Methanosarcinales werden in verschiedenen anaeroben Habitaten gefunden. Methanosarcinales sind in der Lage, eine Reihe unterschiedlicher Substrate zur Energiegewinnung zu nutzen. Die Gattung *Methanosarcina* beinhaltet sowohl acetotrophe und hydrogenotrophe Arten wie *Methanosarcina barkeri* und *Methanosarcina acetivorans*. Aus Proben von anaeroben Böden von Reisfeldern wurden Arten wie *Methanosarcina barkeri*, *Methanosarcina thermophila* und *Methanosarcina semesiae* isoliert (WU ET AL. 2006). In Laborfermentern beschickt mit Glucose wurde eine andere Art, *Methanosarcina mazei*, als eine dominierte Art beschrieben (FERNANDEZ ET AL. 1999). Ähnliche Methanosarcinales konnten auch aus Biogasfermentern in Kofermentationen von Rübensilage mit Gülle isoliert werden. *Methanosarcina acetivorans* C2A, *Methanosarcina mazei* und *Methanosarcina barkeri* sind an dieser Fermentation beteiligt (KLOCKE ET AL. 2007).

Zu der Ordnung Methanosarcinales gehört auch die ausschließlich acetotrophe Gattung *Methanosaeta*. Vertreter dieser Gattung wie z.B. *Methanosaeta concilii* finden sich in Prozessen der Abwasserreinigung (SEKIGUCHI ET AL. 1998) und in anaeroben Belebtschlammreaktoren (LECLERC ET AL. 2001).

## 2.5 Technische Systeme zur Erzeugung von Biogas

### 2.5.1 Fermentationen mit granuliertem Schlamm

Der Reaktor mit granuliertem Schlamm ist eine neuere Entwicklung eines anaeroben Hochleistungsreaktors zur Abwasserreinigung. Hierbei besteht der granuliert Schlamm aus einem Konglomerat von immobilisierten anaeroben Mikroorganismen (DUBOURGUIER ET AL. 1988). Dieser Reaktortyp bietet optimale Bedingungen und Schutz für die an den Abbauprozessen beteiligten Mikroorganismen wie den methanogenen Archaea und die syntrophischen Bacteria (HOFMAN-BANG ET AL. 1988).

Typische Konstruktionsformen mit granuliertem Schlamm sind UASB-Reaktoren (*upflow anaerobic sludge blanket*). Andere Systeme sind ESGB-Reaktoren (*expanded granular sludge blanket*) (LETINGA, 1996; VAN LIER, 1997), UBF-Reaktoren (*upflow sludge bed filters*) (MACLEOD ET AL. 1990; FANG & KWONG, 1995) oder kompartimentierte UASB-Reaktoren (SEGHEZZO ET AL. 1998). Der Betrieb dieser Reaktoren erfolgt unter mesophilen und thermophilen Bedingungen, seltener unter psychrophilen Bedingungen.

### 2.5.2 Rührkessel-Reaktoren

Der Rührkessel-Reaktor oder CSTR-Reaktor (*completely stirred tank reactor*) ist ein aufgrund seiner einfachen Konstruktion insbesondere in der Landwirtschaft häufig verwendeter Reaktortyp. Der CSTR-Reaktor besteht im einfachsten Falle nur aus einem luftdichten Behälter mit einem Rührwerk zur vollständigen Durchmischung des Reaktorsinhalts. Der CSTR-Reaktor wurde anfangs vorrangig für die Biogasgewinnung aus Gülle und anderen flüssigen Medien angewandt. Wenn die Konzentration von Biomasse sehr hoch ist, wie z.B. bei einer überwiegenden oder ausschließlichen Fermentation von nachwachsenden Rohstoffen, ist das einfache Rührkesselsystem jedoch nicht in der Lage, das Substrat genügend zu durchmischen. In solchen Fällen müssen ergänzende technische Lösungen eingerichtet werden.

### 2.5.3 Anaerobe Festbettreaktoren mit Biofilm

Festbettreaktoren (*fixed bed reactor*) oder Anaerobfilter werden bislang hauptsächlich im Rahmen der Abwasserreinigung eingesetzt. Festbettreaktoren bestehen aus einem geschlossenen Behälter mit Füllkörpern unterschiedlicher Zusammensetzung, welcher

von unten nach oben mit der Prozessflüssigkeit (Substrat) durchströmt wird. Die Mikroorganismen wachsen auf dem Trägermaterial der Füllkörper. Gegenüber suspendierter Biomasse zeichnet sich der Biofilm auf den Füllkörpern durch eine größere Artenvielfalt aus (AMANN ET AL. 1992, RASKIN ET AL. 1996).

#### 2.5.4 Substrate für die Biogasgewinnung

Die Biogas-Ausbeute hängt von vielen Faktoren ab, wie z.B. von der Art des Substrates und dessen chemischer Zusammensetzung. Heutige Biogasanlagen im ländlichen Raum werden meist in Flüssigfermentation oder als Kofermentationsanlagen betrieben. Bei letzterem werden dem Reaktor zusätzlich zur Gülle als Grundsubstrat andere organische Stoffe als Kosubstrate zugeführt. Die Bewertung der Substrate erfolgt nach verschiedenen Kriterien, die sowohl die Methanertragspotentiale und den Einfluss auf die Mikrobiologie sowie den Chemismus des anaeroben Abbaus berücksichtigen (PLÖCHL & HEIERMANN. 2002).

In Biogasanlagen der Landwirtschaft wird häufig Rinder- und Schweingülle als Grundsubstrat eingesetzt. Diese stabilisiert den Fermentationsprozess auf Grund seiner Zusammensetzung und gleicht Schwankungen in der Qualität des Gärsubstrats aus. Die Methanausbeute aus der Gülle hängt vom Tierleistungsniveau und von der Fütterungsintensität ab. Die höchsten Methanausbeuten werden bei mittlerer Tierleistung und bei ausgeglichener Fütterung erreicht (AMON 2003).

Zur Steigerung der Biogasausbeute lässt sich die nährstoffarme Gülle mit anderen, häufig festen Substraten ergänzen. Im landwirtschaftlichen Bereich sind verschiedene Kulturarten, so genannte Energiepflanzen, dafür geeignet und werden gezielt für eine spätere Verwendung zur Biogaserzeugung angebaut. Beispiele hierfür sind Silomais, verschiedene Getreide-Ganzpflanzensilagen, Gräser mit hohem Biomasseertrag, Rüben und andere Feldfrüchte. Bei der Nutzung von Energiepflanzen ist das Ziel, einen möglichst hohen Methanertrag pro Hektar bei geringst möglichen Kosten für Ernte, Anbau und Konservierung zu erreichen.

Organische Produktionsabfälle, die aus der Nahrungs- und Genussmittelindustrie stammen und z.B. von Brauereien, Brennereien, Keltereien oder der Zuckerindustrie erzeugt werden, sind unter bestimmten Rahmenbedingungen für die Fermentation gut geeignet, da sie geringe Trockenmassegehalte aufweisen und meist leicht biologisch abbaubar



sind. Die Nährstoffzusammensetzung solcher Abfälle variiert bei gleichem Erzeuger kaum, so dass die Mikroflora in einem Biogasreaktor sich leicht adaptieren kann.

Anders ist es im Falle fester Bioabfälle aus der kommunalen Sammlung. Hier spielt die Kofermentation bislang eine untergeordnete Rolle. Häufig finden sich zudem in diesen Abfällen Stör- und Schadstoffe, welche sich hier negativ auf den Gärprozess auswirken und sowohl die Qualität des Gärrückstandes mindern als auch die Ausbeute an Biogas reduzieren.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Bioreaktorbetrieb und Probennahme**

##### **3.1.1 Betrieb des CSTR-Reaktors**

Die Probennahme erfolgte aus einem CSTR-Biogasreaktor, welcher semikontinuierlich mit Maissilage beschickt wurde. Das Nutzvolumen betrug 3 l (Abb. 4). Der CSTR wurde gestartet mit einem Aliquot aus dem Ablauf eines anderen CSTR. Über einen thermostatbeheizten Wassermantel erfolgte die Temperierung des Reaktors auf 35 °C (mesophiler Prozess). Zur Durchmischung des Reaktorinhalts wurden zeitschaltuhrgesteuerte Stahl-Plexiglas-Rührer verwendet. Das produzierte Biogas wurde in einem Gasbeutel gesammelt.

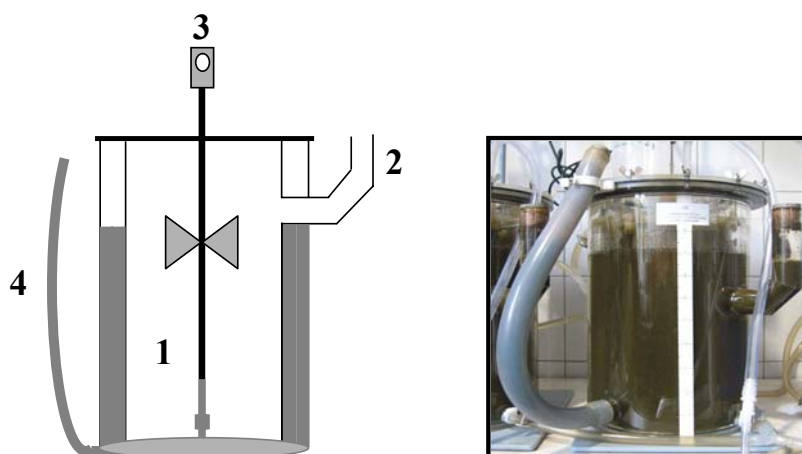
Der Reaktor wurde über einen Zeitraum von 11 Wochen analysiert. Zu Beginn des Versuchs wurde der Biogasreaktor mit Rindergülle beschickt. Nach einer Woche wurde zusätzlich Maissilage als ergänzendes pflanzliches Substrat verwendet. Danach und nach fünf Wochen wurde der Reaktor mit Rübensilage als Kosubstrat parallel mit Maissilage und Gülle beschickt.

Die Analyse der Inhaltsstoffe für die Silage erfolgte nach LINKE ET AL. (2005). Folgende Parameter wurden für Maissilage errechnet: Trockensubstanz (TS,  $T = 105\text{ °C}$ ) 88,5 % Frischmasse (FM), organische Trockensubstanz (oTS) 92,4 % TS, pH 4,3, organische Säuren (orgS)  $3,3\text{ g kg}^{-1}$ , Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl 1,7 % TS, Rohfettgehalt 8,27 % TS, Saccharidgehalt 4,98 % TS, Rohfasergehalt 25,52 % TS. Die Beladungsrate für die Maissilage betrug  $1\text{ g oTS l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ .

Für die Rübensilage wurden die folgenden Parameter ermittelt: Trockensubstanz (TS, bei  $T = 60\text{ °C}$ ) 15,8 % Frischmasse (FM), organische Trockensubstanz (oTS) 92,46 % TS, pH 4,2, organische Säuren (orgS)  $6,0\text{ g kg}^{-1}$ , Gesamtstickstoffgehalt nach Kjeldahl 1,24 % TS, Rohfettgehalt 0,12 % TS, Saccharidgehalt 28,05 % TS, Rohfasergehalt 6,55 % TS. Die Beladungsrate für die Rübensilage betrug  $0,3\text{ g oTS l}^{-1}\text{ d}^{-1}$ .

Die Analyse der Inhaltsstoffe der Gülle erfolgte nach LINKE ET AL. (2005). Es wurden ermittelt: Trockensubstanz (TS, bei  $T = 105\text{ °C}$ ) 8,3 % Frischmasse (FM), organische Trockensubstanz (oTS) 6,7 FM % TS, pH 7,3 und organische Säuren (orgS)  $7,3\text{ g l}^{-1}$ .

Diese Belastungsrate wurde über zwei Wochen konstant gehalten. Nach diesem Zeitraum erfolgte die Probennahme (Probenvolumen 50 ml) direkt aus dem Ablauf. Weitere zwei Probennahmen erfolgten nach der Übersäuerung des Biogasreaktors.



**Abb. 4: Aufbau des CSTR Biogasreaktors (CSTR, Vergärung von Mais- und Rübensilage mit Gülle) (1) Reaktorraum, (2) Substratzufuhr, (3) Rührwerk, (4) Abfluss**

### 3.1.2 Betrieb des kombinierten Systems aus *leach-bed* Reaktor und Anaerobfilter

Das *leach-bed* System bestand aus zwei Stufen: Drei parallel geschaltete *leach-bed* Reaktoren (LBR) sowie einem mit diesen in Reihe geschalteten Festbettreaktor (Anaerobfilter, AF) (Abb. 5).

Zur Entwicklung einer effektiven Mikroflora war der AF mit Füllkörnern (Oberfläche/Volumen  $305 \text{ m}^2 \text{ m}^{-3}$ ) gepackt. Die LBR wurden im Aufstrom, der AF im Abstrom bezogen auf die Prozessflüssigkeit betrieben. Das Nutzvolumen für jeden Bioreaktor betrug annähernd 70 l. Der Reaktorbetrieb erfolgte bei  $38 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ . Die LBR wurden wechselweise wöchentlich ausschließlich mit Triticale-Silage als einzigem Substrat beschickt. Der Ablauf aus den LBR wurde als Substrat für den AF genutzt (Flussrate:  $36,8 \text{ l d}^{-1}$ , 16 Zugaben pro Tag).

Die Biogas-Produktion wurde mit einem Zylindergasmeter (Ritter Apparatebau, Bochum, Deutschland) gemessen. Die Methangehalte wurden mit einem IR-Sensor (Pronova Analysetechnik, Berlin, Deutschland) analysiert. Die pH-Wert-Bestimmung erfolgte mit zwei WTW pH 340i pH-Metern mit SenTix Sonde (WTW, Weilheim, Deutschland). Die Gehalte an kurzkettigen Fettsäuren (VFA,  $\text{C}_2\text{-C}_6$ ) im Ablauf von LBR und AF wurden mit einem Fisons GC 8000 Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor (FID) (Thermo Fischer Scientific, CE Instruments, Milan, Italy) und DB-FFAP Fused Silica Capillary Säule (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) bestimmt.

Im Abstand von sieben Tagen wurde wechselweise einer der LBR geöffnet und neu mit frischer Silage befüllt. Es ergibt sich eine Feststoff-Verweilzeit von 21 Tagen für jeden LBR. Während der Neubefüllung wurde die Prozessflüssigkeit außerhalb des Reaktors

gelagert und anschließend wieder eingefüllt. Die eingefüllte Silagemenge betrug für jeden LBR zwischen 20-24 kg bzw. 0,35-0,42 kg l<sup>-1</sup>. Die durchschnittliche Häcksellänge der Triticale-Silage betrug 2 cm. Der Feststoffanteil lag bei 30,9 % (w/w) bezogen auf die Frischmasse (FM) und 95,4 % (w/w) bezogen auf die organische Trockensubstanz (oTS).

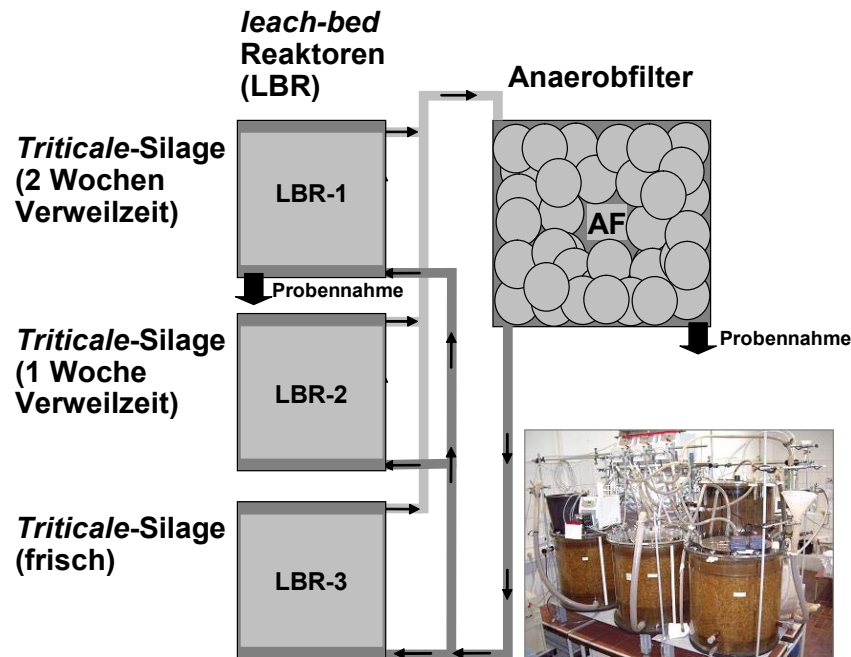


Abb. 5: Aufbau des kombinierten Systems aus *leach-bed* Reaktor und Anaerobfilter

### 3.2 DNA-Extraktion

Die Isolierung und die Reinigung von prokariotischer DNA aus Probenmaterial aus dem Ablauf von CSTR, LBR und AF erfolgte nach RHEIMS & STACHEBRANDT (1999).

Nach einer Zentrifugation von 10 ml Probe zum Sedimentieren des Zellpellets wurde dieses in 20 ml 0,12 M Na-Phosphat-Puffer (pH 8,0) rückgelöst. Die in Na-Phosphat-Puffer suspendierten Zellen wurden erneut für 10 min bei 5000 ×g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet erneut in frischem Puffer gelöst. Dieser Waschschrift wurde sooft wiederholt bis der Überstand sich nicht mehr verfärbte.

Zum Pellet wurde 1 Vol säuregewaschenes PVPP gegeben und dieses mit 1300 µl Na-EDTA-Puffer gelöst. Nach Zugabe von 20 µl Lysozym (10 mg/ml) wurde die Probe 30 min bei 37 °C inkubiert. Eine weitere Inkubation von 45 min bei 65 °C erfolgte nach der Zugabe von 20 µl Proteinase K (1 % w/v) sowie 100 µl einer 10 % SDS-Lösung.

Es folgte ein Gefrierschritt. Dazu wurde die Probe bei -196 °C mit N<sub>2</sub> eingefroren und anschließend im Wasserbad bei 65 °C wieder aufgetaut. Dieser Schritt wurde 3× wiederholt. Das Lysat wurde 10 min bei 7500 ×g zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf einer NaCl-Konzentration von 0,7 M eingestellt. Es wurden der Probe 2 % (w/v) CTAB zugegeben. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten bei 65 °C. Dann wurde 1 Vol. Chloroform-Isopentylalkohol im Verhältnis 24:1 hinzugegeben. Die Probe wurde gut gemischt und 5 min bei 3000 ×g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde sooft wiederholt bis das Chloroform keine Färbung mehr aufwies bzw. die Proteine vollständig ausgefallen waren.

Der DNA-haltige Überstand wurde mit ¼ Vol. 3 M Na-Acetat (pH 5,2) gemischt. Zur Fällung der DNA wurde 1 Vol. Isopropanol zugegeben, 1 h bei -20 °C inkubiert und dann 10 min bei 14000 ×g zentrifugiert. Das Pellet wurde 2× mit 70 % Ethanol gewaschen, dann getrocknet und mit einem geeignetem Volumen Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

### **3.3 Vervielfältigung der prokaryotischen 16S rDNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Aufgrund der großen phylogenetischen Distanz zwischen methanbildenden Archaea und fermentativen Bacteria wurden diese beiden Domänen in zwei getrennten Versuchsansätzen untersucht.

Zur Ermittlung der archaellen Artenvielfalt wurde eine für Archaea spezifische 16S rDNA Bank angelegt. Hierzu wurde folgendes Protokoll verwendet:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in einem Biometra T gradient 96 Thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz unter konstanter Kühlung angesetzt: Template-DNA 100 ng DNA, 1 × PCR-Puffer, 1,5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µmol l<sup>-1</sup> Vorwärts-Primer, 0,2 µmol l<sup>-1</sup> Rückwärts-Primer, je 0,2 mmol l<sup>-1</sup> dNTP, 0,8 U *Taq*-DNA-Polymerase (rekombinant), ad 20 µl Endvolumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Alle Chemikalien und Enzyme waren von Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland). Zur spezifischen Amplifikation der 16S rDNA von Archaea wurden die Primer Arch16S-Forw2 5'-YGA YTA AGC CAT GCR AGT-3' (entsprechend Position 15 - 32 bp *Escherichia coli* 16S rDNA) (modifiziert nach FERNANDES ET AL. 1999) und Univ16S-Rev5 5'- TGC TCC CCC GCC AAT TCC T-3'

**3'** (entspr. Pos. 915 - 934 bp *E. coli* 16S rDNA) (Größe des Amplikons ca. 900 bp) (modifiziert nach GIOVANNONI ET AL. 1990) verwendet.

Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm: (1) Erste Denaturierung: 120 s bei 95 °C, (2) Cycle-Denaturierung: 30 s bei 95 °C, (3) Anlagerung der Primer: 60 s bei 46 °C, (4) Verlängerung der Primer: 60 s bei 70 °C, (5) Finale Extension: 300 s bei 70 °C. Die Schritte 2 bis 4 wurden 34x wiederholt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C.

Zur Ermittlung der bakteriellen Artenvielfalt wurde entsprechend dem obigen Protokoll eine zweite, für Bacteria spezifische 16S rDNA Bank angelegt. Hierfür wurden folgende Primer verwendet: 16S-Forw **5'– AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG 3'** (entspr. Pos. 8 - 28 bp *E. coli* 16S rDNA) (LANE 1991) und 16S-Rev **5'– TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T–3'** (entspr. Pos. 1490 - 1512 bp *E. coli* 16S rDNA) (Größe des PCR-Produkts von 1500 bp) (modifiziert nach LANE 1991). Das PCR-Programm lautete: (1) Erste Denaturierung: 120 s bei 94 °C, (2) Cycle-Denaturierung: 30 s bei 94 °C, (3) Anlagerung der Primer: 30 s bei 53 °C, (4) Verlängerung der Primer: 60 s bei 70 °C, (5) Finale Extension: 900 s bei 70 °C. Die Schritte 2 bis 4 wurden 29x wiederholt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C.

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem 1,2 %-igen Agarosegel in Tris-Acetat-Puffer und nachfolgender Detektion unter UV-Licht nach Färbung mit Ethidiumbromid (SAMBROCK & RUSSELL 2001). Die Größe des PCR-Produktes wurde im Vergleich mit einem Größenmarker überprüft. Die Bande mit dem PCR-Produkt wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mittels einem Kit (Qiaquick Gel Extraction Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) entsprechend der Herstellerangaben gereinigt.

### **3.4 Klonierung und Reaktionsanalyse der amplifizierten 16S rDNA (ARDRA)**

Das gereinigte PCR-Produkt wurde in ein pGEM-T Plasmid (Promega, Mannheim, Deutschland) mittels TA-Klonierung ligiert und anschließend in kompetente Zellen vom Typ *Escherichia coli* str. Novablue (Promega) entsprechend den Herstellerangaben transformiert. Die transformierten Zellen wurden über einen Ausstrich auf Agarplatten vereinzelt. Die resultierenden Klonkulturen wurden folgendermaßen benannt: ATB-KS-[lfd. Nummer].

Aus den einzelnen Klonkulturen wurde das jeweilige rekombinierte Plasmid mit einem handelsüblichen Kit (E.N.Z.A. Plasmid Miniprep Kit I, Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) isoliert und gereinigt. Mit einer Restriktionsanalyse (*Nco*I / *Sal*I Verdau) (Fermentas) wurde getestet, ob die Plasmide ein Insert von erwarteter Länge beinhalteten.

Zur Ermittlung der Sequenzunterschiede zwischen den klonierten PCR-Amplifikaten wurde eine *amplification* rDNA *restriction analysis* (ARDRA) nach dem bei KLOCKE ET AL. (2007) beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Das Insert eines jeden Plasmids wurde mittels einer PCR unter Verwendung von plasmidlokalisierten Startpunkten vermehrt. Die PCR wurde in einem Biometra T gradient 96 Thermocycler (Whatman Biometra) durchgeführt. Für die PCR wurde folgender Reaktionsansatz unter konstanter Kühlung angesetzt: 10 ng Plasmid-DNA, 1x PCR Puffer, 1,5 mmol l<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µmol l<sup>-1</sup> Vorwärts-Primer, 0,2 µmol l<sup>-1</sup> Rückwärts-Primer, jeweils 0,2 mmol l<sup>-1</sup> dNTP, 0,8 U *Taq*-DNA-Polymerase (native), ad 20 µl Endvolumen H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> Alle Chemikalien und Enzyme wurden von Fermentas geliefert. Als Primer wurden Standard-Primer für die T7 und SP6 Promotor Region im pGEM-T Plasmid verwendet (T7-Promotor-Primer **5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'**, SP6-Promotor-Primer **5'ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'**).

Folgendes PCR-Programm wurde angewandt: (1) Initiale Denaturierung: 120 s bei 94 °C, (2) Cycle-Denaturierung 30 s bei 94 °C, (3) Anlagerung der Primer: 60 s bei 47 °C, (4) Verlängerung der Primer: 120 s bei 70 °C, (5) Finale Extension: 300 s bei 70 °C. Die Schritte 2 bis 4 wurden 29x wiederholt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C. 2 µl PCR-Produkt wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1,2 %iges Agarosegel in Tris-Acetat-Puffer aufgetrennt und nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht detektiert (SAMBROCK & RUSSELL 2001). Hierbei wurde geprüft, ob die PCR-Produkte die erwartete Größe aufwiesen. Die restlichen 18 µl PCR-Produkt wurden mit 1,5 U *Bsu*RI und 1,5 U *Hin*6I (Fermentas) für 12 h bei 37 °C verdaut. Zur Auftrennung der sehr kleinen DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau (< 500 bp) wurde eine hochauflösende Gelelektrophorese (3,5 % (w/v) Metaphor-Agarose in Tris-Acetat-Puffer) (Cambrex Bioscience, Rockland, USA) durchgeführt. Die Detektion der ARDRA-Fingerprint-Muster erfolgte wie zuvor beschrieben durch Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht.

### 3.5 Sequenzierung und phylogenetische Analyse

Nach einem visuellen Vergleich der ARDRA Muster wurden repräsentative Klone für jedes individuelle ARDRA Muster ausgewählt und deren 16S rDNA Insert sequenziert. Alle Sequenzierungen sind von MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt worden. Die Sequenzen wurden als operative taxonomische Einheiten (operational taxonomic units, Abk. OTU) verwendet. Für eine taxonomische Einordnung wurden die Sequenzen mit den Einträgen in der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006) unter Verwendung der BLASTN-Software (ALTSCHUL ET AL. 1990, ALTSCHUL ET AL. 1997) verglichen. Die Genbank-Einträge mit der höchsten Sequenzübereinstimmung wurden in die phylogenetische Analyse einbezogen. Ergänzend wurden 16S rDNA Sequenzen von Typenstämmen sowie anderer kultivierter Stämme repräsentativ für die jeweiligen Gattungen als Referenz ausgewählt. Die Gruppierung der ermittelten Sequenzen mit den Referenzsequenzen erfolgte mit der Software ClustalW (CHENNA ET AL. 2003). Für die weitere phylogenetische Auswertung wurde die Software MEGA Version 3.0 (KUMAR ET AL. 2003) benutzt. Die Konstruktion eines phylogenetischen Baumes erfolgte nach der *neighbour-joining* Methode (SAITO & NEI 1987). Eine *bootstrap resampling analysis* (FELSENSTEIN 1985) für 1000 Replikate wurde zur Abschätzung der Signifikanz der Baumtopologie durchgeführt. Als Basis für alle phylogenetischen Analysen wurde das taxonomische System von Bergey's Manual (GARRITY ET AL 2001) verwendet.

### 3.6 Anlage von Stammkulturen

Um Stammkulturen von Klonen anzulegen, wurde eine Übernachtskultur von *E. coli* (800 µl LB-Flüssigmedium in einem 2 ml Reaktionsgefäß) mit 800 µl Glycerin-Puffer versetzt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Mikrobielle Diversität in einer biogas-produzierenden Kofermentation von Maissilage und Rindergülle (Normaler Prozesszustand)

Die Struktur der mikrobiellen Gemeinschaft in einem klassischen anaeroben Biogasreaktor vom CSTR-Typ bei einem normalen Prozesszustand wurde durch eine Analyse der 16S rDNA Sequenz kombiniert mit der ARDRA-*fingerprint*-Methode untersucht. Hierzu wurden zwei verschiedene 16S rDNA Bibliotheken, welche jeweils für methanogene Archaea und fermentative Bacteria spezifisch waren, angefertigt und getrennt analysiert.

#### 4.1.1 Betrieb des CSTR

Die Probennahme zur Ermittlung der mikrobiellen Diversität erfolgte nach zwei Wochen kontinuierlichen Betriebs des CSTR bei konstanter täglicher Substratzufuhr mit Maissilage und Gülle bei einer Belastungsrate von  $3 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Zum Zeitpunkt der Probennahme betrug die Biogasbildungsrate  $1,5 \text{ l}_{\text{Biogas}} \text{ l}_{\text{Reaktorvolumen}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die Biogasausbeute bezogen auf die organische Trockensubstanz betrug  $0,46 \text{ l kg}^{-1} \text{ oTS}$ , bezogen auf die eingesetzte Frischmasse entspricht dies  $0,44 \text{ l kg}^{-1} \text{ FM}$ .

Das Biogas enthielt 57,0 % Methan ( $\text{CH}_4$ ), 40,8 % Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), 413 ppm Wasserstoffgas ( $\text{H}_2$ ), 2062 ppm Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

Die Probennahme zur Ermittlung der mikrobiellen Diversität erfolgte drei Wochen nach Beginn des Fermentationsversuches und zwei Wochen nach dem Einstellen einer konstanten oTS-Raumbelastung mit Maissilage und Rindergülle von insgesamt  $3 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Zum Zeitpunkt der Probennahme betrug die Biogasrate bezogen auf das Reaktorvolumen  $1,5 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die auf Wochenbasis ermittelte Biogasausbeute für die organische Substanz lag bei  $0,46 \text{ l g}^{-1}$ .

Im produzierten Biogas wurden im 7-Tage-Mittel vor der Probennahme 56,1 Vol.% Methan, 40,7 Vol.% Kohlendioxid, 1981 ppm Schwefelwasserstoff und 411 ppm Wasserstoff gemessen.

Im betrachteten Zeitraum wurde in der Prozessflüssigkeit von den untersuchten flüchtigen Fettsäuren ( $\text{C}_2$  bis  $\text{C}_6$ ) ausschließlich die Anwesenheit von Essigsäure nachgewiesen und zwar mit Gehalten zwischen  $0,12$  und  $0,41 \text{ g l}^{-1}$ . Der pH-Wert betrug zwischen 7,71 und 8,06 ohne einen erkennbaren Trend.

Des Weiteren wurden in der Prozessflüssigkeit in der Wochenmischprobe vor der Probenahme für die mikrobiellen Analyse folgende Stoffkonzentrationen ermittelt: TS 5,87 %, oTS 74,8 % FM,  $\text{NH}_4\text{-N}$  2,28 g l<sup>-1</sup> und Gesamt-N 3,87 g l<sup>-1</sup>.

#### 4.1.2 Analyse der 16S rDNA Bibliotheken

Zur Detektion der Biodiversität innerhalb der Phyla Archaea und Bacteria wurden zwei 16S rDNA Klonbanken spezifisch für jedes Phylum entwickelt und mittels ARDRA analysiert.

Vertreter der Domäne Archaea wurden ausschließlich in der Archaea-spezifische 16S rDNA Bank detektiert. Diese Bank umfasste 81 Klone mit verschiedenen 24 ARDRA-Mustern, welche als *operational taxonomic units* (OTU) gehandhabt wurden (Tab. 1).

**Tab. 1: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für methanogene Archaea.<sup>1</sup>**

|                                | OTU         | 16S rDNA Klone |
|--------------------------------|-------------|----------------|
| <b>Domäne Archaea</b>          |             |                |
| Phylum Euryarchaeota           | 14 (58,3 %) | 68 (83,9 %)    |
| Ordnung Methanomicrobiales     | 8 (57,1 %)  | 58 (85,2 %)    |
| Ordnung Methanosarcinales      | 3 (21,4 %)  | 6 (8,8 %)      |
| Ordnung Methanobacteriales     | 2 (14,2 %)  | 3 (4,4 %)      |
| Ordnung Methanococcales        | ND          | ND             |
| Unklassifizierte Euryarchaeota | 1 (7,1 %)   | 1 (1,4 %)      |
| <b>Domäne Bacteria</b>         |             |                |
| Phylum Firmicutes              | 9 (37,5 %)  | 10 (12,3 %)    |
| Unklassifizierte Bacteria      | 1 (4,1 %)   | 3 (3,7 %)      |

Von diesen erwiesen sich 14 verschiedene OTU (= 58,3 %) in der phylogenetischen Analyse der zugehörigen Nukleotidsequenz als Vertreter der Archaea-Domäne. Diese 14 OTU wurden bei 68 der Klone (= 83,9 %) detektiert.

Desweiteren wurden auch mehrere OTU bakteriellen Ursprungs in der Archaea 16S rDNA Bibliothek gefunden. Diese OTU waren bei 13 der Klone (16 %) vertreten. Die Auswertung der Nukleotidsequenz dieser OTU ergab eine Zugehörigkeit zu unklassifizierten *Clostridium*-Arten (10 Klone, 12,3 % aller Klone) bzw. zu taxonomisch nicht näher bestimmbaren Vertretern der Bacteria (3 Klone, 3,7 % aller Klone).

Von der 16S rDNA Bank spezifisch für Bacteria wurden insgesamt 118 Klone analysiert. Hierbei wurden 58 verschiedene ARDRA Muster detektiert (Tab. 2). Innerhalb

<sup>1</sup> Die prozentualen Angaben beziehen sich auf Ebene der Phyla auf alle Klone der 16S rDNA Bibliothek, auf Ebene der Ordnungen der Euryarchaeota ausschließlich auf die Zahl der Archaea-Klone in der 16S rDNA Bibliothek. ND= Nicht detektiert.

dieser Bank konnten alle detektierten OTU auf Vertreter der Domäne Bacteria zurückgeführt werden.

**Tab. 2: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für fermentative Bacteria.**

|                               | OTU         | 16S rDNA Klone |
|-------------------------------|-------------|----------------|
| <b>Domäne Bacteria</b>        |             |                |
| Phylum Firmicutes             |             |                |
| Klasse Clostridia             | 26 (44,8 %) | 55 (46,6 %)    |
| Klasse Mollicutes             | 1 (1,7 %)   | 1 (0,8 %)      |
| Phylum Bacteroidetes          | 13 (22,4 %) | 17 (14,4 %)    |
| Phylum Proteobacteria         |             |                |
| Klasse Alpha-Proteobacteria   | 1 (1,7 %)   | 1 (0,8 %)      |
| Klasse Gamma-Proteobacteria   | 2 (3,4 %)   | 2 (1,6 %)      |
| Klasse Epsilon-Proteobacteria | 1 (1,7 %)   | 1 (0,8 %)      |
| Phylum Spirochaetes           | 2 (3,4 %)   | 6 (5 %)        |
| Phylum Fibrobacteres          | 1 (1,7 %)   | 1 (0,8 %)      |
| Phylum Chloroflexi            | 1 (1,7 %)   | 1 (0,8 %)      |
| Unklassifizierte Bacteria     | 10 (17,2 %) | 33 (27,9 %)    |

#### 4.1.2.1 Domäne Archaea

In dem Biogasreaktor wurden ausschließlich Archaea aus dem Phylum Euryarchaeota detektiert. Alle nachgewiesenen Archaea waren Vertreter von methanogenen Gattungen.

Am häufigsten wurden Vertreter der Methanomicrobiales nachgewiesen. Insgesamt 8 OTU repräsentativ für 58 Klone konnten dieser Ordnung zugeordnet werden (Abb. 6).

Innerhalb der Ordnung Methanomicrobiales erwies sich die Gattung *Methanoculleus* als diejenige mit der höchsten Diversität. 6 unterschiedliche OTU zeigten in einem Vergleich der 16S rDNA Sequenzen eine hohe Übereinstimmung mit der Referenz *Methanoculleus bourgensis* DSM 3045 [AY196674]. Eine dieser OTU (ATB-KS-076) war repräsentativ für 22 Klone und damit für 25,9 % aller analysierten Klone. Diese 6 OTU zeigten eine hohe Ähnlichkeit mit 16S rDNA Sequenzen, welche aus Sickerwasser einer Mülldeponie in China, Provinz Guangdong (Klon GZK7 [AJ576208]) sowie aus einem mesophilen Protein-Digestor (Klone BSA2A-01 [AB175346] und BSA2A-05 [AB175350]) isoliert wurden.

Auch die zweite Familie der Ordnung Methanomicrobiales, die Methanocorpusculaceae, war mit einer OTU repräsentativ für einen Klon vertreten. Die 16S rDNA Sequenz dieser OTU ATB-KS-221 zeigte eine sehr hohe Übereinstimmung mit der Sequenz von *Methanocorpusculum parvum* DSM 14092 [M59147].

Eine OTU repräsentativ für 28,2 % der Klone der Archaea-spezifischen 16S rDNA Bank zeigte in der phylogenetischen Einordnung eine Gruppierung mit einem Vertreter

der dritten Familie, den Methanospirillaceae. Zu dem Referenzstamm *Methanospirillum hungatei* JF1 [AY196683] wies OTU ATB-KS-085 eine Sequenzübereinstimmung von 92 % auf.

Die Ordnung der Methanosarcinales war mit drei OTU vertreten. Zwei OTU repräsentativ für jeweils einen Klon der 16S rDNA Bank zeigten eine hohe Ähnlichkeit zu *Methanosarcina barkeri* DSM 800 [AY012094], dem Typenstamm für die Gattung *Methanosarcina*. Entsprechende 16S rDNA Sequenzen wurden bereits unter anderem aus dem Sickerwasser einer französischen Mülldeponie (Klon 221 [AJ801161]) sowie aus einem anaeroben, thermophilen Festmüll-Digestor in Japan (Klon MANA01 [AB114309]).

Ebenfalls vertreten war die zweite Familie der Methanosarcinales, die Methanosaetaeae. Die OTU ATB-KS-077 zeigte eine Sequenzübereinstimmung von 90 % mit der Sequenz von *Methanosaeta concilii* Opfikon [X16932]. Die OTU wurde bei 4 Klonen der 16S rDNA Bank gefunden.

Zu der Ordnung Methanobacteriales gehörten zwei OTU, ATB-KS-152 und ATB-KS-155. OTU ATB-KS-152 wurde bei einem Klon der für Archaea spezifischen 16S rDNA Bank nachgewiesen. Er zeigte eine Sequenzübereinstimmung von 91 % zu dem Typenstamm *Methanobrevibacter ruminantium* DSM 1093 [AY196666]. Eine höhere Sequenzähnlichkeit war mit den unkultivierten Klonen ARC52 [AF029182] und ARC23 [AF029175] isoliert aus dem Rumen von Rindern gegeben. Die OTU ATB-KS-155 repräsentativ für zwei Klone zeigte in der phylogenetischen Einordnung eine größere Distanz zu dieser Gruppe, wies aber weniger Ähnlichkeiten zu Referenzarten anderer Gattungen der Methanobacteriaceae auf.

Für die Ordnung Methanococcales wurden keine entsprechenden OTU detektiert.

Die OTU ATB-KS-162 (repräsentativ für 1 Klon) konnte in keine dieser vier Ordnungen eingeordnet werden. In dem phylogenetischen Baum ist diese OTU zwischen den Vertretern der Methanosarcinales / Methanomicrobiales und den Methanobacteriales angesiedelt. Größere Übereinstimmungen in der 16S rDNA Sequenz fanden sich nur mit unkultivierten Klonen wie DF86 [AY816986] und Ar21 [AF157522]. Diese Klone wurden aus Lagern für Schweinegülle und –mist isoliert.

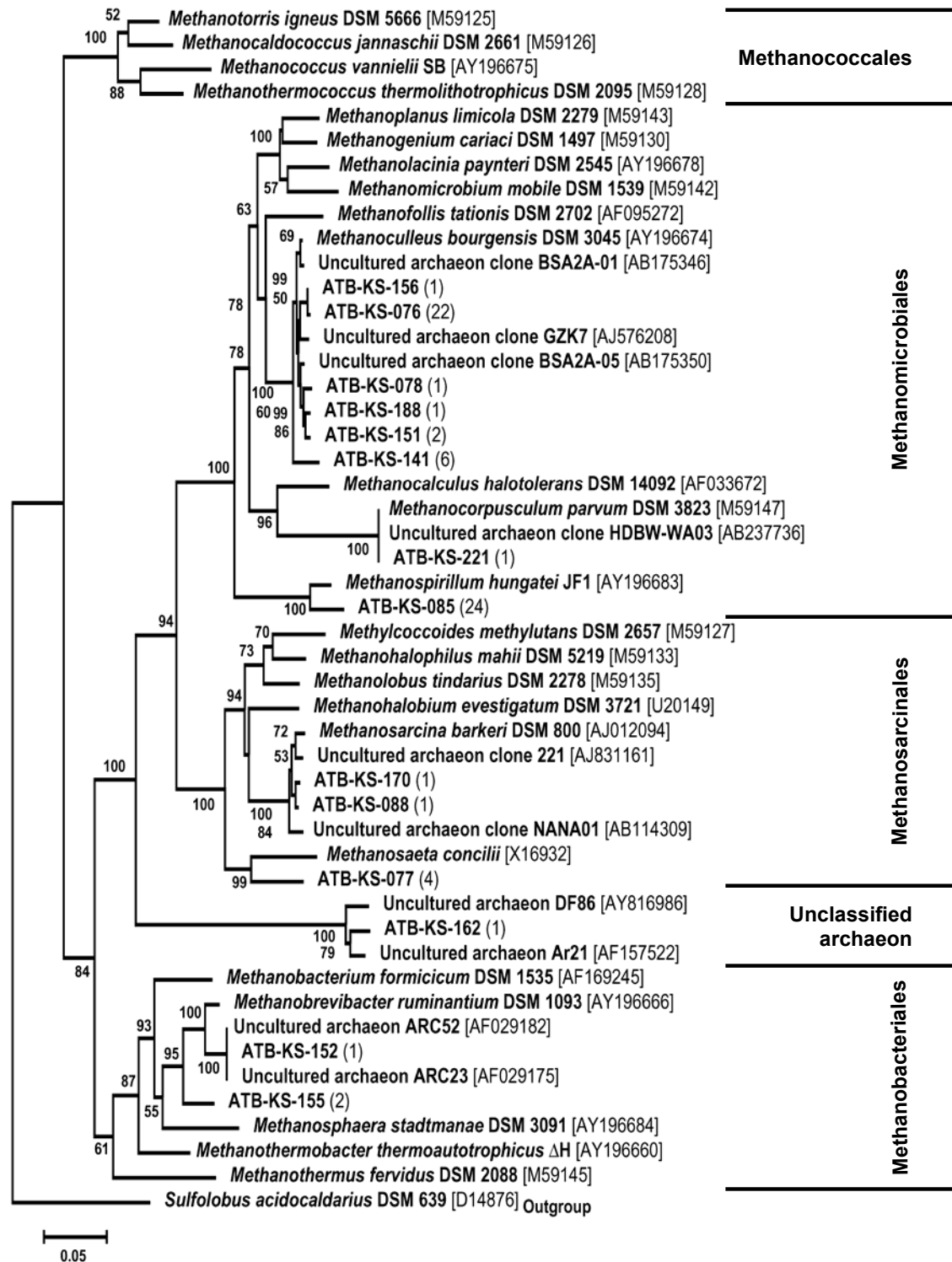


Abb. 6: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylums Euryarchaeota der Domäne Archaea.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einem ca. 800 bp großem Fragment der 16S rDNA. Die Clusteranalyse erfolgte unter Verwendung des *neighbor-joining* Verfahrens (SAITO & NEI 1987) in Kombination mit dem Substitutionsmodell von Jukes-Cantor (JUKES & CANTOR 1969) und 1000x *bootstrap-resampling* (FELSENSTEIN 1985). Die *bootstrap*-Werte sind an den Knoten wiedergegeben, nur *bootstrap*-Werte > 49 % wurden dargestellt. Für Referenz-Nukleotidsequenzen sind die entsprechenden Akzessionsnummern der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006) in eckigen Klammern aufgeführt. *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 diente als *outgroup*.

#### 4.1.2.2 Domäne Bacteria

##### *Phylum Firmicutes*

Innerhalb der Domäne Bacteria ist die Gruppe der Firmicutes am Häufigsten vertreten. Sie wird in der bakteriellen 16S rDNA Bank durch 56 Klone (= 48 % aller Klone) repräsentiert (Abb. 7). Von den drei Klassen der Domäne Bacteria konnten nur Vertreter der Klassen Clostridia und Mollicutes (repräsentativ für 27 OTU) nachgewiesen werden, Vertreter der Klasse Bacilli fehlten. Die größte Anzahl an OTU (15 OTU repräsentativ für 34 Klone) ließ sich der Familie Clostridiaceae zuordnen. Die Klone der bakteriellen 16S rDNA Bank zeigten hierbei nur begrenzt Ähnlichkeiten zu Kulturstämmen wie *C. aldrichii* DSM 6159 [X71846], *C. jejuense* str. HY-35-12 [AY494606], *C. straminisolvens* str. CSK1 [AB125279] oder *C. alkalicellum* str. Z-7026 [AY959944]. In der überwiegenden Zahl wurden jedoch Ähnlichkeiten zu den 16S rDNA Sequenzen unkultivierter Mikroorganismen, welche zuvor bereits in verschiedenen Umweltproben nachgewiesen wurden, gefunden. So wurden ähnliche Mikroorganismen anhand ihrer 16S rDNA Sequenzen unter anderem in einem Bioreaktor für Nahrungsmittelabfälle in Korea (Klon F117 [DQ232857]), in einem Digester für pharmazeutische Abfälle in den USA (Klon tbr1-10 [AF280825]) sowie in dem Magen-Darm-Trakt von dänischen Schweinen (Klon p-5278-2Wa3 [AF371938]) nachgewiesen.

Hohe Ähnlichkeiten zu bislang unkultivierten Mikroorganismen ließen sich in analoger Weise bei allen anderen detektierten Familien der Klasse Clostridia beobachten. Sechs OTU konnten der Familie Syntrophomonadaceae zugeordnet werden, jedoch zeigten die detektierten 16S rDNA Sequenzen nur begrenzt Ähnlichkeiten mit denen von kultivierten Referenzarten. Ähnliche Mikroorganismen wurden dagegen in den Umweltproben wie z.B. aus Sedimenten (Klon LS4-242 [AB234271]) oder in einem Natriumbicarbonatsee in Kalifornien (Klon ML23-ANME11 [AY245489]) gefunden.

Eine einzelne OTU (Klon ATB-KS-1524) konnte mit Referenzstämmen der Familie Lachnospiraceae in Verwandtschaft gebracht werden. Die Sequenzähnlichkeit dieser OTU zu *Ruminococcus flavefaciens* ATCC 19208 [L76603] betrug 78 %. 16S rDNA Sequenzen für ähnliche Mikroorganismen wurden unter anderem in China (Klon KD-35 [AY218560]) und in Bodenproben aus den USA (S-F26 [AY622268]) nachgewiesen.

Vier OTU ließen sich keiner bestimmten taxonomischen Gruppe innerhalb der Klasse Clostridia zuordnen. Eine große Sequenzübereinstimmung lag jedoch zu Klonen aus verschiedenen Umweltproben vor wie z.B. zu Klon GZK101 [AJ853594] isoliert aus

Deponiesickerwasser, Klon BSA2B-09 [AB175381] aus einem mesophilem BSA-degradierendem Bioreaktor oder Klon MBA08 [AB114318] aus einem thermophilen Abwasser-Bioreaktor.

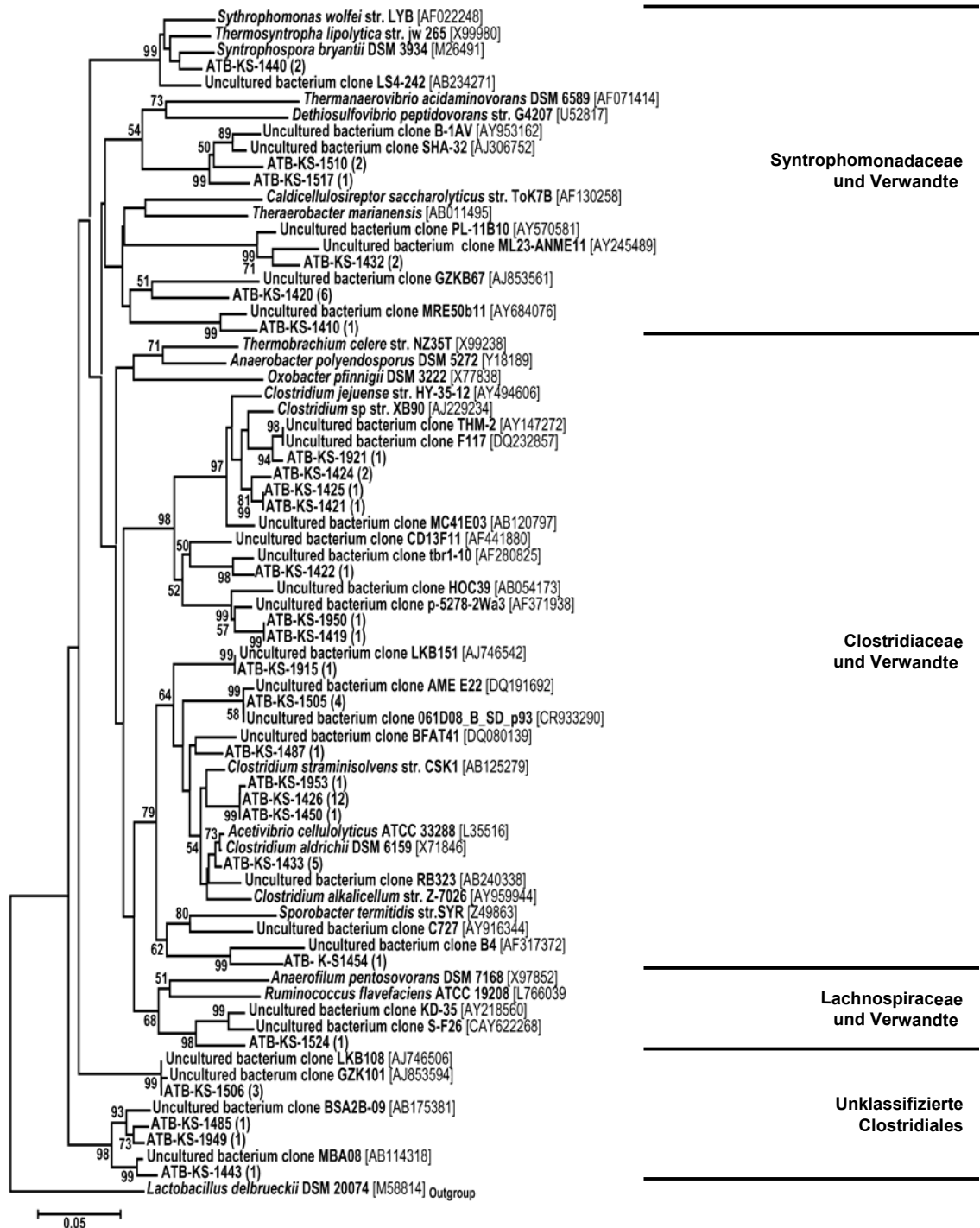


Abb. 7: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Clostridia der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

Innerhalb der Klasse **Mollicutes** wurde eine OTU ATB-KS-1431 repräsentativ für einen Klon detektiert. Diese OTU zeigte eine Sequenzübereinstimmung von (76 - 87 %) zu *Holdemania filiformis* ATCC 51649 [Y11466] sowie zu einer Reihe unkultivierter Mollicutes wie z.B. Klon pGXAR27 [DQ266900] nachgewiesen in einem alkalischen Boden in China (Abb. 8).

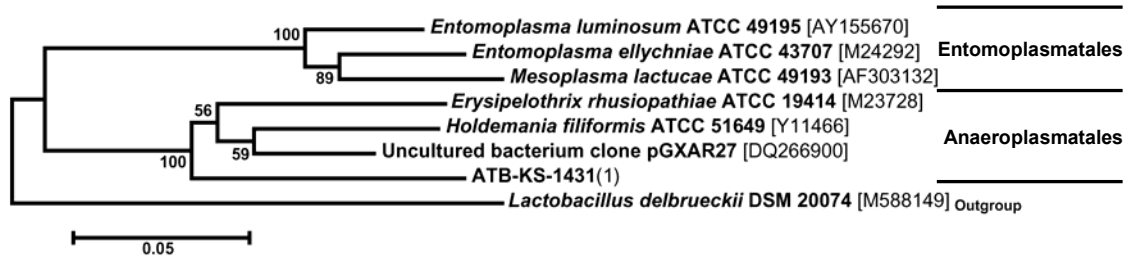


Abb. 8: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Mollicutes der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

#### Phylum Bacteroidetes

13 OTU der bakteriellen 16S rDNA Bank konnten dem Phylum Bacteroidetes zugeordnet werden (Abb. 9). In der phylogenetischen Analyse der 16S rDNA Sequenzen konnte der überwiegende Anteil der OTU innerhalb der Klassen Flavobacteria und Bacteroides gruppiert werden.

Vier OTU repräsentativ für jeweils einen Klon konnten mit Vertretern der Klasse Flavobacteria gruppiert werden. Die OTU ATB-KS-1411 und ATB-KS-1934 zeigten eine hohe Ähnlichkeit von 99 % und 93 % zu Kulturstämmen wie z.B. *Ruminofilibacter xy-nalolyticum* str. S1 [DQ141183] und *Aequorivita antarctica* str. S4-8 [Ay771732]. Ähnliche Mikroorganismen wurden anhand von 16S rDNA Sequenzen unter anderem in Seesedimenten in Deutschland (Klon c5LKS4 [AM086105]) oder in Höhlensedimenten in Italien (Klon WM100 [DQ415789]) nachgewiesen.

Die Klasse Bacteroides konnte mit insgesamt fünf OTU entsprechend acht Klonen der 16S rDNA Bank nachgewiesen werden. Wie auch in dem Phylum Firmicutes traten die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu unkultivierten Klonen aus Umweltproben auf, wie z.B. zu Klon LKB109 [AJ746507] isoliert aus Deponiesickerwasser in China, Klon 009C01\_B\_SD\_P15 [CR33168] isoliert aus Abwasserproben in Frankreich und Klon ET10-9 [DQ443965] isoliert aus einem schwefel-reduzierenden Digestor in China.

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.



In der phylogenetischen Analyse bildeten vier OTU zusammen mit 16S rDNA Sequenzen von verschiedenen unkultivierten Klonen zwei Cluster abseits der üblichen drei taxonomischen Klassen. Drei dieser OTU zeigten dabei in der Analyse ihrer 16S rDNA Sequenzen nur geringe Unterschiede und bildeten einen eigenen Cluster. Aufgrund der größeren Sequenzunterschiede zu den Referenzarten der Klasse Sphingobacteria ist eine Zugehörigkeit zu dieser Klasse fraglich. Wie auch in den zuvor beschriebenen Klassen zeigten sich die höchsten Sequenzähnlichkeiten zu unkultivierten Klonen aus Umweltproben. Beispiele hierfür sind Klon EUB50-2 [AY693829] isoliert aus anaerobem Schlamm in Thailand und die Klone T20H80A09 [AB244036] und p3h06ct-1 [AY578592], welche in der Rumen-Mikroflora von Rindern in Japan und in USA nachgewiesen wurden.

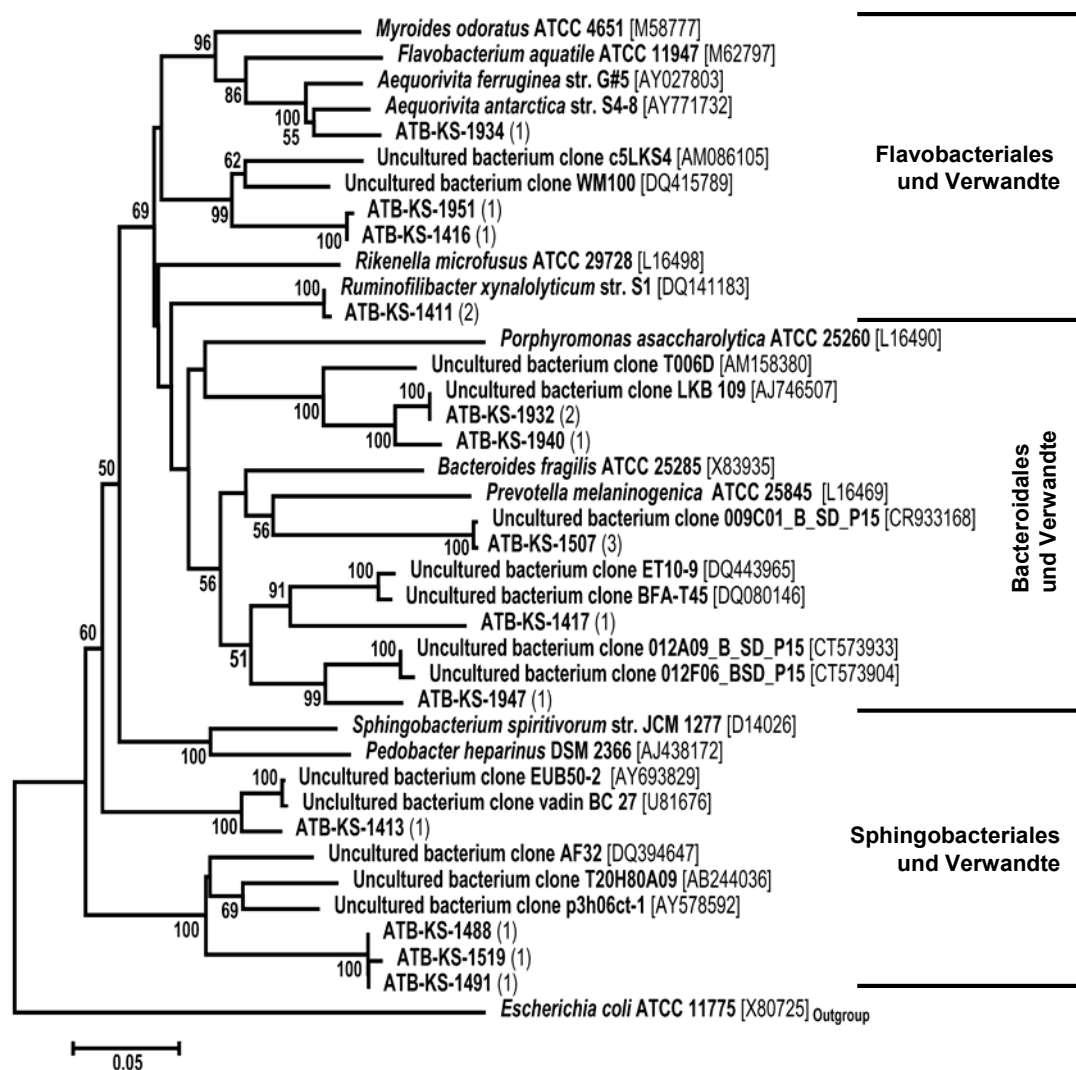


Abb. 9: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Phylum Bacteroides der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Escherichia coli* ATCC 11775 [X80725] diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

### Phylum Proteobacteria

Unter den fünf Klassen innerhalb des Phylums Proteobacteria konnten Vertreter von drei Klassen ( $\alpha$ -,  $\gamma$ -,  $\epsilon$ -Proteobacteria) anhand entsprechender OTU nachgewiesen werden.

Die Klasse der **Alphaproteobacteria** wurde repräsentiert durch eine OTU (ATB-KS-1444). In der phylogenetischen Analyse konnte diese OTU mit symbiotischen (Abb. 10) Wurzelknöllchenbakterien der Rhizobiaceae gruppiert werden. Aus Leguminosen (MOREIRA ET AL. 1998) und aus dem Boden (VACCA ET AL. 2005) konnte der Stamm *Xhantobacter agilis* str. SA35 [X94198] isoliert werden, welcher eine Sequenzähnlichkeit 95 % zu ATB-KS-1444 aufweist. Die Klasse **Gammaproteobacteria** (Ordnung Pseudomonadales) war mit zwei OTU repräsentativ für jeweils einen Klon der bakteriellen 16S rDNA Bank vertreten (Abb. 11).

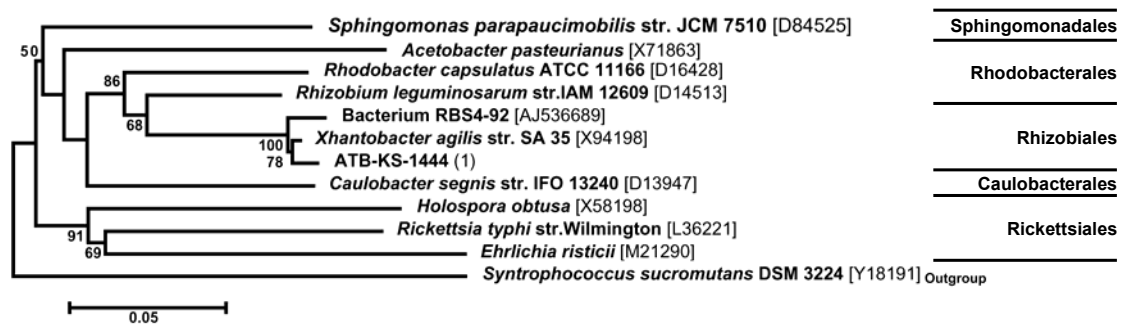


Abb. 10: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Alphaproteobacteria der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

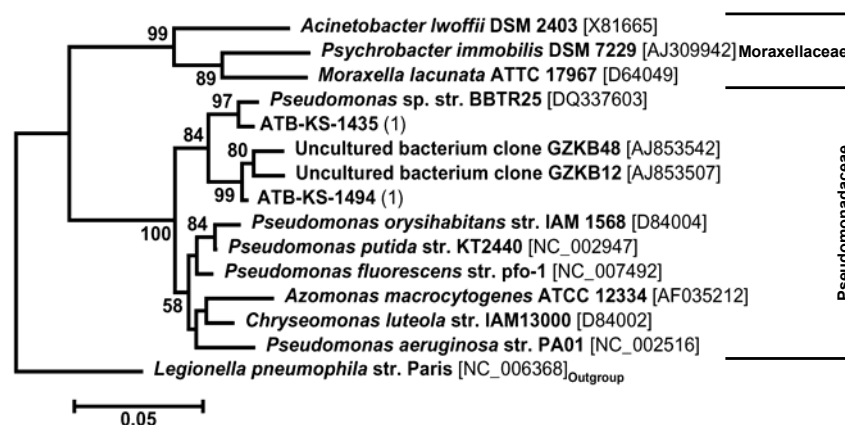


Abb. 11: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Gammaproteobacteria der Domäne Bacteria.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Syntrophococcus sucromutans* DSM 3224 [Y18191] diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

<sup>2</sup> *Legionella pneumophila* str. Paris [NC\_006368] diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

Der Klon ATB-KS-1494 ist in der phylogenetischen Analyse mit den unklassifizierten Klone GZKB12 [AJ853507] und GZKB48 [AJ853542] isoliert aus Deponiesickerwasser und Abwasser gruppiert. Der Klon ATB-KS-1435 zeigt eine sehr hohe Ähnlichkeit von 99 % auf Ebene der 16S rDNA Nukleotidsequenz zu dem Stamm *Pseudomonas* sp. str. CL-2 [DQ337603].

Die Klasse der Epsilonproteobacteria war ebenfalls mit einer einzigen OTU (ATB-KS-1516) vertreten (Abb. 12). Dieser Klon konnte innerhalb der einzigen Ordnung der Epsilonproteobacteria, den Campylobacterales, zusammen mit Vertretern der Gattung *Arcobacter* gruppiert werden. Zu der 16S rDNA Sequenz von *Arcobacter* sp. 16695-3 [AY314754] wies Klon ATB-KS-1516 eine Sequenzähnlichkeit von 97 % auf. Dieser Stamm wurde ursprünglich aus tierischen Fäkalien isoliert.

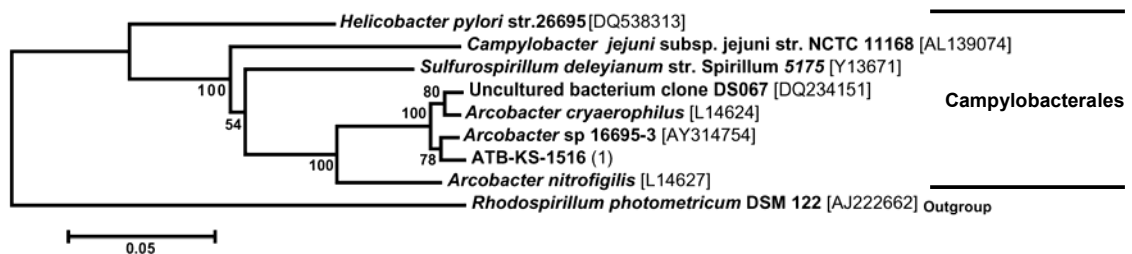


Abb. 12: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Epsilonproteobacteria der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

### Phylum Spirochaetes

Zwei OTU, ATB-KS-1452 und ATB-KS-1434, repräsentativ für zusammen sechs Klone der bakteriellen 16S rDNA Bank konnten dem Phylum Spirochaetes zugeordnet werden (Abb. 13). Klon ATB-KS-1452 gruppierte in der phylogenetischen Auswertung mit dem unkultivierten Klon LKB86 [AJ746489] isoliert aus Deponiesickerwasser, Klon ATB-KS-1434 ist verwandt mit Isolat *Spirochaeta zuelserae* [M88725] mit 91 % Sequenzähnlichkeit. Trotz der Unterschiede in der Sequenz der 16S rDNA zu Typenstämmen zeigte die phylogenetische Analyse für beide Klone eine eindeutige Zuordnung zu der Familie Spirochaetaceae.

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Rhodospirillum photometricum* DSM 122 [AJ222662] diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

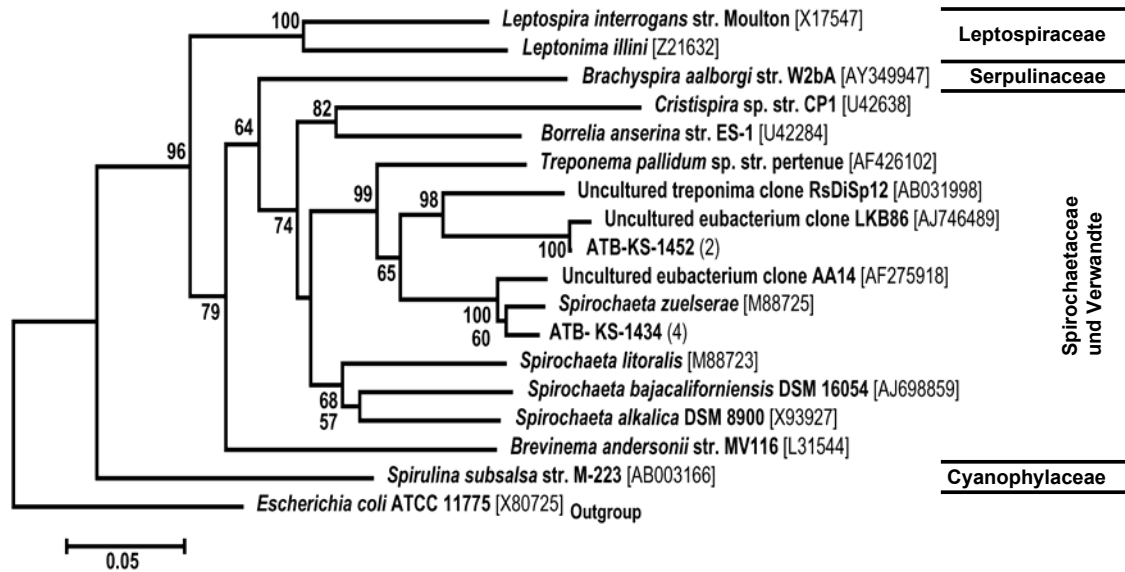


Abb. 13: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylum Spirochaetes der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

#### Phylum Chloroflexi

Eine OTU, ATB-KS-1492, welche durch einen Klon in der bakteriellen 16S rDNA Bank vertreten wurde, konnte in der phylogenetischen Auswertung mit Referenzarten des Phylums Chloroflexi gruppiert werden (Abb. 14). Hierbei traten größere Sequenz-ähnlichkeiten (96 %) jedoch nur zu anderen unkultivierten Klonen auf. Beispielhaft sind die Klone JN18A7F [DQ168648] isoliert aus Sedimenten (USA) oder die Klone 261 und 955 [AY935659, AY935680] isoliert aus einer Fermentation von Abfall aus einer Olivenmühle in Spanien zu nennen.

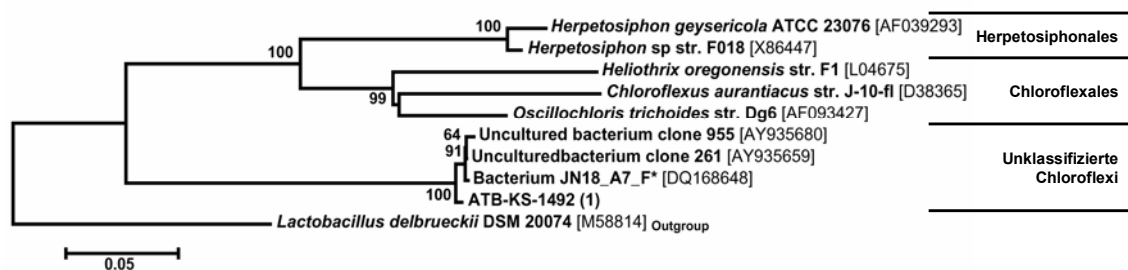


Abb. 14: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylum Chloroflexi der Domäne Bacteria.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Escherichia coli* ATCC 11775 [X80725] diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

<sup>2</sup> *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

### Phylum Fibrobacteres

Das Phylum Fibrobacteres war ebenfalls mit nur einer einzigen OTU, ATB-KS-1923, vertreten (Abb. 15). Dieser Klon zeigte eine hohe Sequenzähnlichkeit mit Stämmen der einzigen Gattung dieses Phylums, *Fibrobacter*. Mit dem Cellulose degradierenden Bakterium *Fibrobacter succinogenes* str. FE [AJ496566] betrug die Sequenzübereinstimmung 89 %.

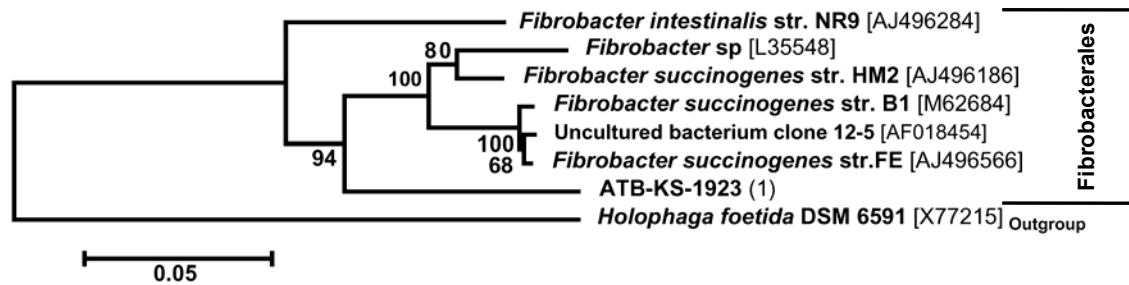


Abb. 15: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylum Fibrobacteria der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

### Unklassifizierte Bakterien

Eine grosse Anzahl von OTU der bakteriellen 16S rDNA Bank konnte keiner bekannten taxonomischen Gruppe direkt zugeordnet werden (Abb. 16). Hierzu zählen zehn OTU repräsentativ für 33 Klone (28 %) der 16S rDNA Bank. Nichtsdestotrotz zeigen diese OTU sehr hohe Sequenzähnlichkeiten von (95 – 97 %) zu anderen unkultivierten Klonen isoliert aus verschiedenen Umweltproben wie z.B. Klon BHB21 [AB237730] und Klon GZKB79 [AJ853573] isoliert aus Tiefengrundwasser in Japan und aus Sickerwasser einer Mülldeponie in China.

In der phylogenetischen Analyse bildeten diese OTU zusammen mit den unkultivierten Klonen drei Cluster. Die meisten OTU konnten in einem Cluster mit Klonen wie GZKB79 [AJ853573] isoliert aus einer Abwasserprobe, BSA2B-20b [AB175392] isoliert aus einem mesophilem, BSA degradierendem Bioreaktor und BHB21 [AB248650] isoliert aus einem mesophilem, Butyrat degradierenden Bioreaktor gruppiert werden. Insgesamt sieben OTU der bakteriellen 16S rDNA Bank gehörten zu diesem Cluster. Auffälligerweise repräsentierte einer dieser Klone, ATB-KS-1409, die höchste Anzahl an Klonen (24 Klone entsprechend 20,3 % aller Klone) verglichen mit den übrigen detektierten OTU.

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Holophaga foetida* DSM 6591 [X77215] diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

Zwei OTU, ATB-KS-1503 und ATB-KS-1929, wurden in der phylogenetischen Analyse mit Klonen isoliert aus salinen Milieus gruppiert. Zu dem unkultivierten Klon QLS20-B20 [AY940536] wiesen die ATB-Klone Sequenzähnlichkeiten von 78 % auf.

Klon ATB-KS-1446 bildete zusammen mit den unkultivierten Klonen PL-11B10 [AY570581] und Klon MS149BH1062003\_13 [DQ354746] in der phylogenetischen Analyse einen dritten Cluster. Zu diesen aus einem Ölreservoir in Frankreich und aus Grundwasser in Südafrika isolierten Klonen wies ATB-KS-1446 eine Übereinstimmung von 93 % innerhalb der 16S rDNA Sequenz auf.

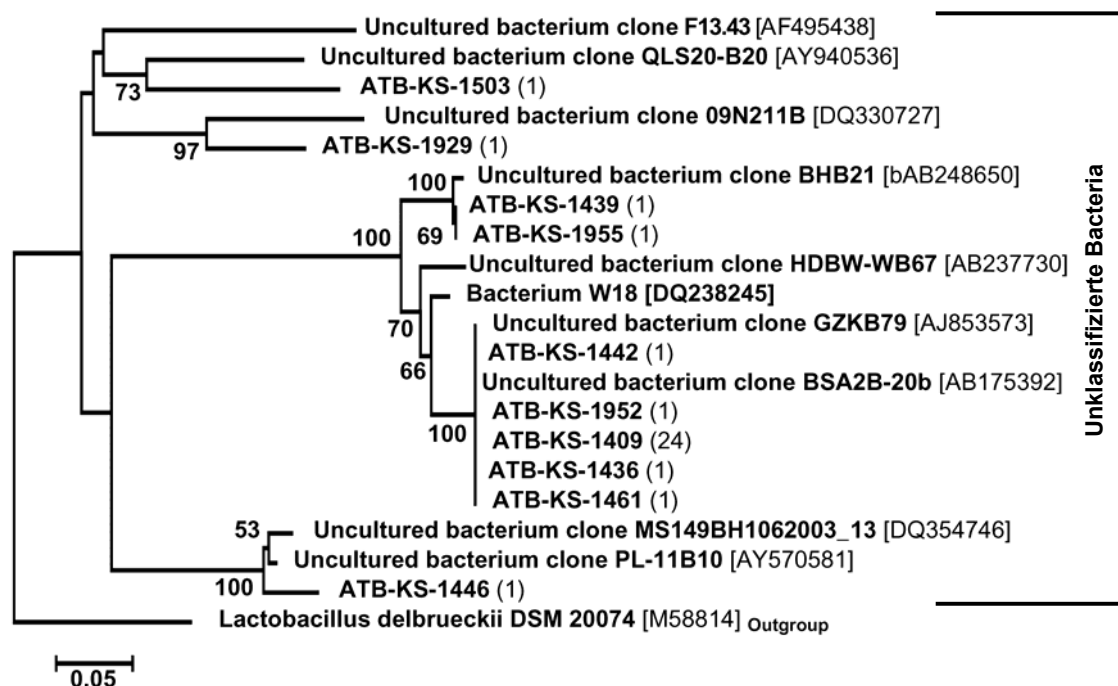


Abb. 16: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der taxonomisch nicht klassifizierten Bacteria.<sup>1</sup>

#### 4.2 Mikrobielle Diversität in einer biogas-produzierenden Kofermentation von Maissilage und Rindergülle (Unnormaler Prozesszustand mit stark erhöhten pH-Werten nach zu starker Belastung)

Zum Vergleich der mikrobiellen Diversität in einem CSTR-Reaktor im Zustand der Übersäuerung mit der mikrobiellen Diversität, wie sie bei einem normalen Betrieb zu beobachten ist, wurde ein identisches experimentelles Vorgehen wie bei der vorherigen Analyse gewählt. Für die Domänen der methanogenen Archaea und fermentativen Bacteria wurden wiederum zwei domänen-spezifische 16S-rDNA-Klonbanken angelegt

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 6.

teria wurden wiederum zwei domänen-spezifische 16S-rDNA-Klonbanken angelegt und mittels ARDRA analysiert.

#### 4.2.1 Betrieb des CSTR

Die Probennahme zur Ermittlung der mikrobiellen Diversität erfolgte nach 11 Wochen kontinuierlichen Betriebs des CSTR bei konstanter täglicher Substratzufuhr mit Maissilage, Rübensilage und Gülle bei einer Belastungsrate von  $14 \text{ g oTS l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Zum Zeitpunkt der Probennahme betrug die Biogasbildungsrate  $4,31 \text{ l}_{\text{Biogas}} \text{ l}_{\text{Reaktorvolumen}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die Biogasausbeute bezogen auf die organische Trockensubstanz betrug  $0,46 \text{ l kg}^{-1} \text{ oTS}$ , bezogen auf die eingesetzte Frischmasse entspricht dies  $0,63 \text{ l kg}^{-1} \text{ FM}$ .

Das Biogas enthielt 57,0 % Methan ( $\text{CH}_4$ ), 40,8 % Kohlendioxid ( $\text{CO}_2$ ), 413 ppm Wasserstoffgas ( $\text{H}_2$ ), 2062 ppm Schwefelwasserstoff ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

Die Probennahme zur Ermittlung der mikrobiellen Diversität erfolgte 8 Wochen nach Beginn des Fermentationsversuches und 7 Wochen nach dem Einstellen einer konstanten oTS-Raumbelastung mit Maissilage, Rübensilage und Rindergülle von insgesamt  $14 \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Zum Zeitpunkt der Probennahme betrug die Biogasrate, bezogen auf das Reaktorvolumen,  $4,31 \text{ l l}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Die auf Wochenbasis ermittelte Biogasausbeute für die organische Substanz lag bei  $0,63 \text{ l g}^{-1}$ .

Im produzierten Biogas wurden nach 8 Wochen in der Probennahme 41,2 Vol. % Methan, 58,7 Vol. % Kohlendioxid, 515 ppm Schwefelwasserstoff und 485 ppm Wasserstoff gemessen.

Im betrachteten Zeitraum wurde in der Prozessflüssigkeit von den untersuchten flüchtigen Fettsäuren ( $\text{C}_2$  bis  $\text{C}_6$ ) ausschließlich die Anwesenheit von Essigsäure nachgewiesen und zwar mit Gehalten zwischen 6,52 und  $9,36 \text{ g l}^{-1}$ . Der pH-Wert lag zwischen 6,18 und 5,81.

Des Weiteren wurden in der Prozessflüssigkeit in der Wochenmischprobe vor der Probennahme für die mikrobiellen Analyse folgende Stoffkonzentrationen ermittelt: TS 7,87 %, oTS 78,60 % FM,  $\text{NH}_4\text{-N}$   $1,54 \text{ g l}^{-1}$  und Gesamt-N  $4,10 \text{ g l}^{-1}$ .

#### 4.2.2 Analyse der 16S rDNA Bibliotheken

Vertreter der Domäne Archaea wurden ausschließlich in der Archaea-spezifischen 16S-rDNA-Bank gefunden. Die Archaea-Bank umfasste 16 Klone mit 13 verschiedenen

ARDRA-Mustern (OTU) (Tab. 3). Von diesen ergab die nachfolgende Sequenzauswertung für fünf Klone eine Zugehörigkeit zu dem Phylum Euryarchaeota (33 % der untersuchten Klone).

**Tab. 3: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für methanogene Archaea.<sup>1</sup>**

|                             | OTU       | 16S rDNA Klone |
|-----------------------------|-----------|----------------|
| <b>Domäne Archaea</b>       |           |                |
| Phylum Euryarchaeota        | 4 (33 %)  | 5 (33 %)       |
| Ordnung Methanomicrobiales  | 4 (100 %) | 5 (100 %)      |
| Ordnung Methanosarcinales   | ND        | ND             |
| Ordnung Methanobacteriales  | ND        | ND             |
| Ordnung Methanococcales     | ND        | ND             |
| <b>Domäne Bacteria</b>      |           |                |
| Phylum Firmicutes           |           |                |
| Unklassifizierte Firmicutes | 5 (42 %)  | 7 (47 %)       |
| Unklassifizierte Bacteria   | 3 (25 %)  | 3 (20 %)       |

Für die restlichen Klone ergab sich eine Gruppierung mit verschiedenen Vertretern der Domäne Bacteria. Sieben dieser Klone (47 %) konnten mit Vertretern der Gattung *Clostridium* gruppiert werden. Die restlichen Klone wiesen höhere Ähnlichkeiten nur zu bislang taxonomisch nicht näher charakterisierten Mikroorganismen aus der Domäne Bacteria auf.

Für 16S rDNA Bibliothek spezifisch für Bacteria wurden insgesamt 102 Klone analysiert. In dieser Analyse wurden insgesamt 51 verschiedene OTU (= ARDRA-Muster) gefunden (Tab. 4). Die phylogenetische Auswertung der zugehörigen Nukleotidsequenzen ergab für alle OTU eine Zugehörigkeit zu der Domäne Bacteria.

**Tab. 4: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für fermentative Bacteria (CSTR-Biogasreaktor im übersäuerten Zustand).**

|                             | OTU         | 16S rDNA Klone |
|-----------------------------|-------------|----------------|
| <b>Domäne Bacteria</b>      |             |                |
| Phylum Firmicutes           |             |                |
| Klasse Clostridia           | 21 (45 %)   | 61 (64 %)      |
| Klasse Bacilli              | 4 (8,5 %)   | 8 (8 %)        |
| Klasse Mollicutes           | 2 (4 %)     | 2 (2 %)        |
| Phylum Bacteroidetes        | 12 (25,5 %) | 15 (16 %)      |
| Phylum Proteobacteria       |             |                |
| Klasse Alpha-Proteobacteria | 1 (2 %)     | 1 (1 %)        |
| Klasse Gamma-Proteobacteria | 4 (8,5 %)   | 5 (5 %)        |
| Klasse Delta-Proteobacteria | 1 (2 %)     | 1 (1 %)        |
| Phylum Spirochaetes         | 1 (2 %)     | 1 (1 %)        |
| Unklassifizierte Bacteria   | 1 (2 %)     | 1 (1 %)        |

<sup>1</sup> Die prozentualen Angaben beziehen sich auf Ebene der Phyla auf alle Klone der 16S rDNA Bibliothek, auf Ebene der Ordnungen der Euryarchaeota ausschließlich auf die Zahl der Archaea-Klone in der 16S rDNA Bibliothek. ND= Nicht detektiert.



#### 4.2.2.1 Domäne Archaea

In dem übersäuerten CSTR-Biogasreaktor wurden nur Archaea aus dem Phylum Euryarchaeota gefunden. Alle detektierten Vertreter des Phylum Euryarchaeota gehören zu den methanbildenden Archaea (Abb. 17).

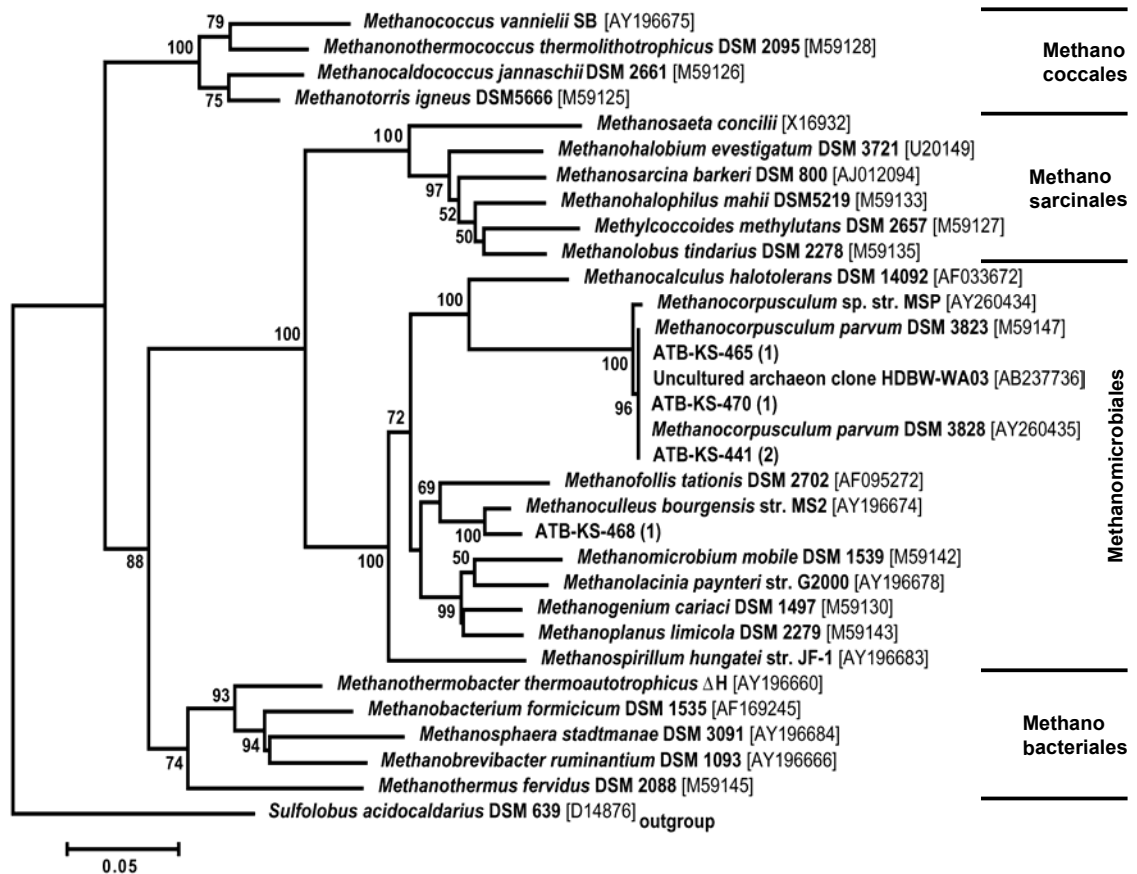


Abb. 17: Phylogenetische Beziehung der ATB-Klone innerhalb des Phylums Euryarchaeota der Domäne Archaea.<sup>1</sup>

Innerhalb der Domäne der Archaea konnten alle vier detektierten OTU mit Vertretern der Ordnung Methanomicrobiales in Beziehung gebracht werden. Keine OTU wurden für die anderen methanbildenden Ordnungen Methanococcales, Methanosarcinales, Methanobacteriales sowie die neuen Gruppen CA-11 (SNELL-CASTRO ET AL. 2005) und ARC-I (GODON ET AL. 1997) detektiert.

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf der Analyse der Nukleotidsequenz eines ca. 800 bp Fragmentes der 16S rDNA. Die Clusteranalyse erfolgte unter Verwendung des *neighbor-joining* Verfahrens (SAITO & NEI 1987) in Kombination mit dem Substitutionsmodell von Jukes-Cantor (JUKES & CANTOR 1969) und 1000x *bootstrap-resampling* (FELSENSTEIN 1985). Die *bootstrap*-Werte sind an den Knoten wiedergegeben, nur *bootstrap*-Werte > 49 % wurden dargestellt. Für Referenz-Nukleotidsequenzen sind die entsprechenden Akzessionsnummern der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006) in eckigen Klammern aufgeführt. *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 diente als *outgroup*.

Zwei OTU, ATB-KS-0465 repräsentativ für einen Klon und ATB-KS-0441 repräsentativ für zwei Klone, haben eine hohe Übereinstimmung von 96 % mit den Stämmen *Methanocurpusculum parvum* DSM 3823 [M59147] und *Methanocurpusculum parvum* DSM 3828 [AY260435] gezeigt. Die OTU ATB-KS-468 (repräsentativ für einen Klon) zeigte eine Ähnlichkeit von 84 % zu der Art *Methanoculleus bourgensis* str. MS2 [AY196674]. Eine OTU, ATB-KS-0470, zeigte die größten Übereinstimmungen (99 %) in der 16S rDNA Nukleotidsequenz mit dem unkultivierten Klon HDBW-WA03 [AB237736], welcher aus Grundwasser (Japan) isoliert wurde.

#### 4.2.2.2 Domäne Bacteria

##### *Phylum Firmicutes*

Aus der Domäne Bacteria wurden Vertreter des Phylum Firmicutes am häufigsten gefunden. Diese wurden in der 16S rDNA Bank spezifisch für Bacteria durch 27 OTU entsprechend 57,5 % aller detektierten OTU repräsentiert. Diese 27 OTU wiederum wurden bei 71 Klonen (= 74 % aller Klone) gefunden. Hierbei wurden aus dem Phylum Firmicutes die drei Klassen Clostridia, Mollicutes und Bacilli nachgewiesen.

Die Klasse **Clostridia** wurde durch 21 Muster repräsentativ für 61 Klone nachgewiesen (Abb. 18). Eine große Anzahl an OTU (i.e. 8 OTU repräsentativ für 34 Klone) wurden in der phylogenetischen Analyse der Familie der Lachnospiraceae zugeordnet. Diese acht OTU zeigten eine hohe Ähnlichkeit mit einem bislang unkultivierten Bakterium-Klon p-2489-18B5 [AF371565], welcher aus dem Gastrointestinaltrakt von Schweinen (Dänemark) gewonnen wurde.

Die Familie der Eubacteriaceae war mit sechs OTU repräsentativ für 17 Klone vertreten. Innerhalb dieser Familie wiesen drei OTU (15 Klone) eine hohe Übereinstimmung mit der Art *Pseudoramibacter alactolyticus* str. 23263 [AB036759]. Zwei OTU, ATB-KS-1037 (1 Klon) und ATB-KS-0979 (1 Klon), zeigten eine größere Ähnlichkeit von 74 % bzw. 80 % auf Basis der partiellen 16S rDNA Nukleotidsequenz mit der Art *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 [D14150] auf. Eine weitere OTU, ATB-KS-0966, konnte mit *Acetobacterium woodii* DSM 1030 [X96954] in Verwandtschaft gebracht werden (Sequenzähnlichkeit 85 %).

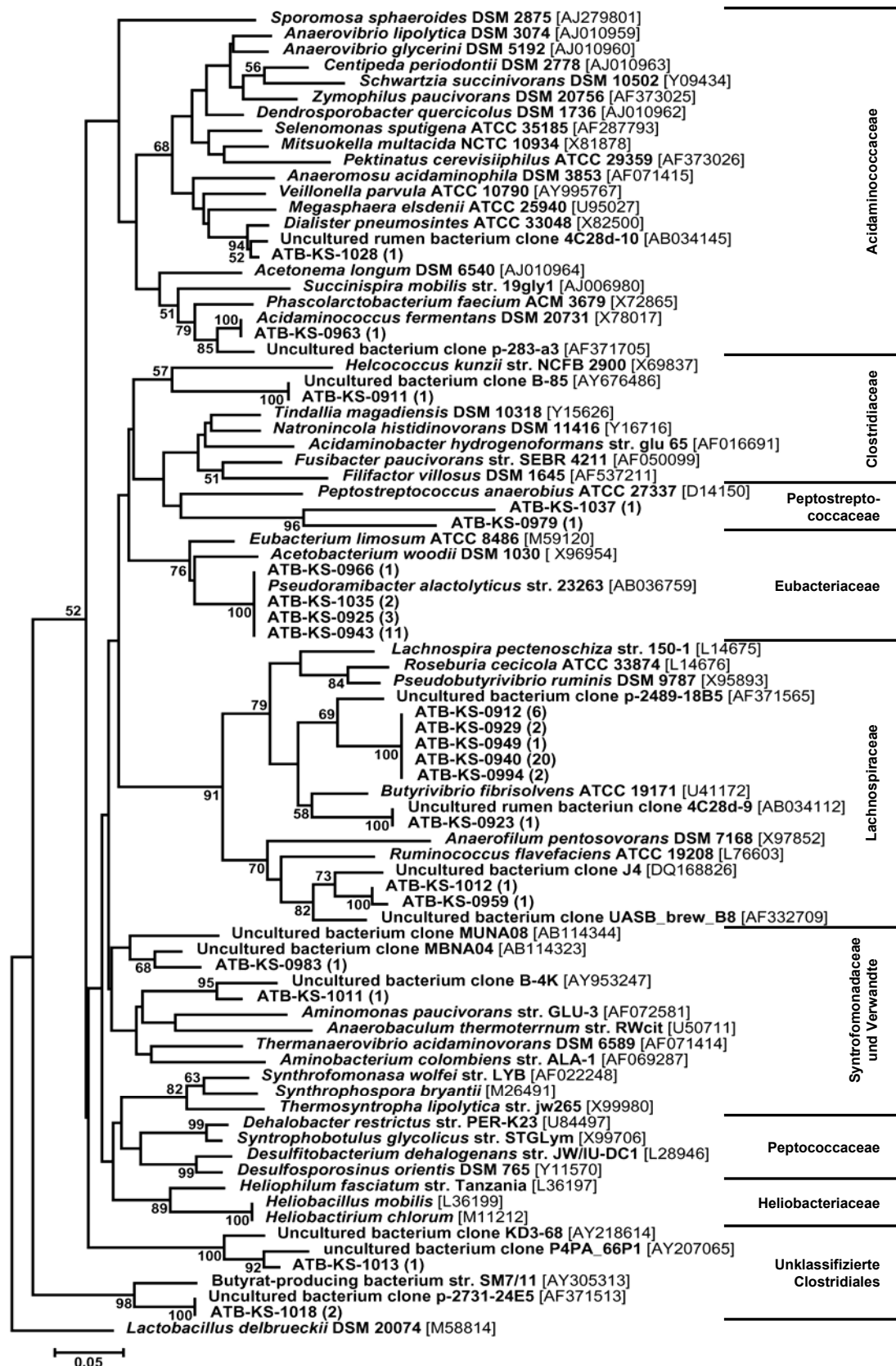


Abb. 18: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Clostridia der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

Zwei OTU konnten der Familie Acidaminococcaceae zugeordnet werden. Dieses waren die Klone ATB-KS-1028 und ATB-KS-0963 jeweils repräsentativ für einen Klon in der 16S rDNA Bibliothek. Diese OTU erwiesen sich als sehr ähnlich zu dem unkultivierten Mikroorganismus 4C28d-10 [AB034145] isoliert aus dem Rinderrumen sowie zu der Art *Acidaminococcus fermentans* DSM 20731 [X78017].

Eine OTU repräsentativ für wiederum nur einen Klon der 16S rDNA Bank wurde in die Familie Clostridiaceae gruppiert. Diese OTU ATB-KS-0911 zeigte eine hohe Ähnlichkeit von 98 % zu dem bislang ebenfalls unkultivierten Klon B-85 [AY676486] isoliert aus einer Probe aus einem Milchkanal beim Rind.

Zwei Klone repräsentativ für jeweils einen Klon wurden zu der Familie Peptostreptococcaceae gruppiert: Die OTU ATB-KS-1037 und ATB-KS-0979 haben eine Übereinstimmung von 74 % und 80 % zu dem Kulturstamm *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337 [D14150].

Die Familie Syntrofomonadaceae wurde mit zwei OTU entsprechend 2 Klone der 16S-rDNA-Bank nachgewiesen. Diese OTU wiesen größere Sequenzähnlichkeiten nur zu bislang unkultivierten Klonen gewonnen aus Umweltproben auf, wie z.B. zu Klon MUNA08 [AB114344] und Klon MBNA 04 [AB114323], welche beide aus einem thermophilen Festmülldigester (Japan) isoliert wurden, sowie zu Klon B-4K [AY953247], welcher aus einem anaeroben Schweinegüllelager (USA) isoliert wurde.

Zwei OTU konnten keiner bestimmten taxonomischen Familie in der Klasse der Clostridia zugeordnet werden. Trotzdem zeigten diese OTU eine große Überstimmung zu Klonen aus verschiedenen Umweltproben wie zu Klon P4PA\_66P1 [AY207065] isoliert aus der menschlichen Mundflora (England) und zu Klon p-2731-24E5 [AF371513] isoliert aus dem Gastrointestinaltrakt von dänischen Schweinen.

Für die restlichen zwei Familien der Klasse Clostridia, Peptococcaceae und Heliobacteriaceae, wurden keine bestimmten OTU gefunden.

Innerhalb der Ordnung Lactobacillales der Klasse **Bacilli** wurden vier OTU detektiert. Davon war eine OTU (ATB-KS-0934) repräsentativ für fünf Klone (Abb. 19).

Alle vier OTU zeigten eine größere Überstimmung in ihrer 16S rDNA Nukleotidsequenz mit den Kulturstämmen *Streptococcus suis* str. 92-2742 [AF009509] und *Streptococcus suis* str. 88-1861 [AF009497].

Keine OTU wurden für die Ordnung Bacillales detektiert.

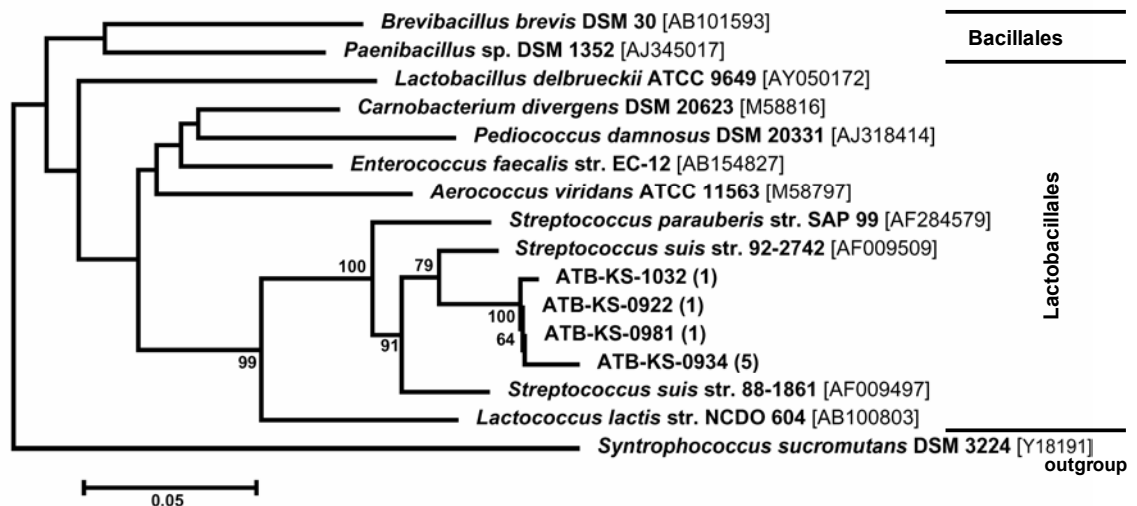


Abb. 19: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Bacilli der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

Zu der Klasse **Mollicutes** konnten zwei OTU, ATB-KS-0968 und ATB-KS-0998, assoziiert werden. Auffälligerweise konnten beide OTU zu keiner bestimmten taxonomischen Ordnung innerhalb der Klasse Mollicutes zugeordnet werden (Abb. 20).

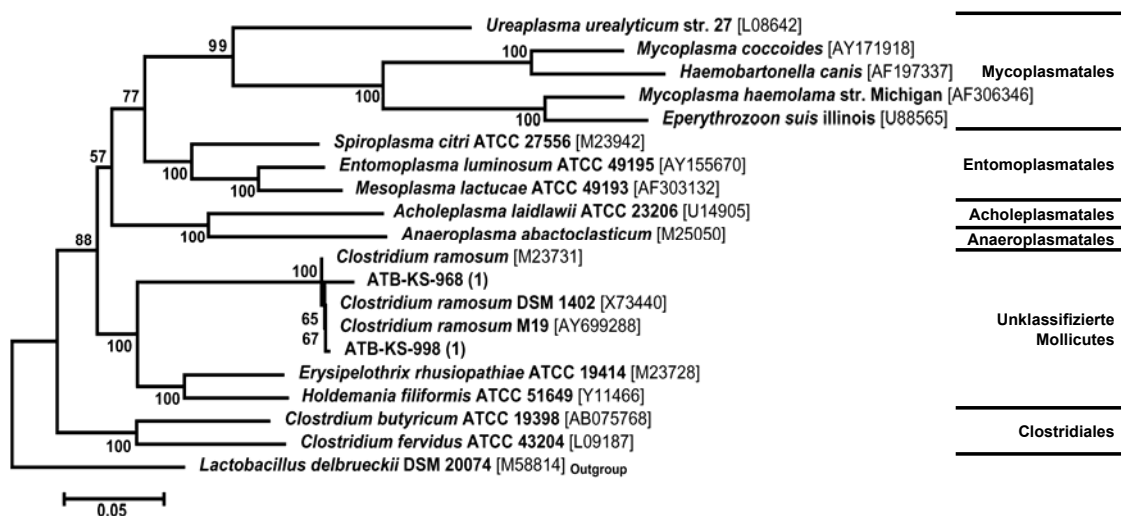


Abb. 20: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Mollicutes der Domäne Bacteria.<sup>2</sup>

Dennoch zeigten die zwei OTU eine hohe Sequenzübereinstimmung mit den Stämmen *Clostridium ramosum* [X73440] von 98 % und *Clostridium ramosum* M19 [AY699288] von 99 %. Hierbei ist jedoch festzustellen, dass in der phylogenetischen Analyse diese als Angehörige der Gattung *Clostridium* klassifizierten Mikroorganismen eine geringere genetische Distanz zu den Referenzstämmen der Mollicutes aufwiesen als zu denen der

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Syntrophococcus sucromutans* DSM 3224 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

<sup>2</sup> *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

Clostridia (FARROW ET AL. 1995; BARTLETT ET AL. 2004). Die taxonomische Einordnung der Art *C. ramosum* und damit der OTU ATB-KS-0968 und ATB-KS-0998 bleibt daher ungenau, die Zuordnung zu den Mollicutes erscheint aber auf Ebene der 16S rDNA als wahrscheinlich.

### *Phylum Bacteroides*

Die Phylum Bacteroides konnte mit 12 OTU entsprechend 15 Klonen der bakteriellen 16S rDNA Bank nachgewiesen werden (Abb. 21).

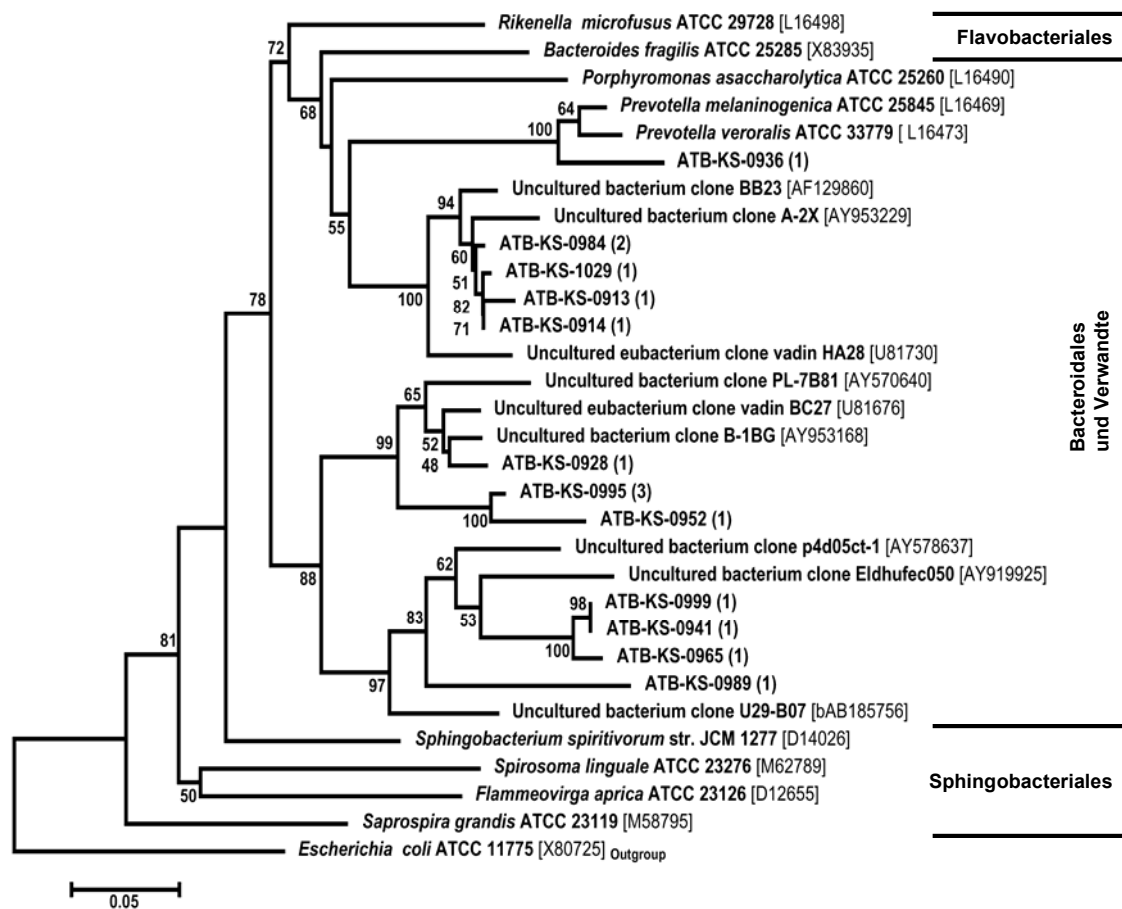


Abb. 21: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Phylum Bacteroides der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

Alle diese OTU wurden zu der Ordnung Bacteroidales gruppiert. Für die übrigen zwei Ordnungen, Flavobacteriales und Sphingobacteriales, wurden keine OTU detektiert.

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Escherichia coli* ATCC 11775 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

Eine OTU (ATB-KS-0936) zeigte eine hohe Ähnlichkeit von 87 % bzw. 90 % mit den Kulturstämmen *Prevotella melalinogenica* ATCC 25845 [L16469] und *Prevotella veroralis* ATCC [L16473].

Die elf weiteren in das Phylum Bacteroides eingeordneten OTU wiesen größere Nukleotidsequenzähnlichkeiten nur zu 16S rDNA Fragmenten isoliert aus verschiedenen Umwelten auf. Beispielhaft seien die klonierte Sequenz Vadin HA28 [U81730] aus Abfall einer Weindestillerie in Frankreich, Sequenz p4d05ct-1 [AY578637] aus einem Rinderrumen in den USA und Sequenz Eldhufec050 [AY919925] aus Stuhlproben vom Menschen in Frankreich genannt.

### *Phylum Proteobacteria*

Drei Klassen (Alpha-, Gamma-, Deltaproteobacteria) der fünf Klassen innerhalb des Phylum Proteobacteria konnten in dem übersäuerten CSTR detektiert werden.

Die Klasse der **Alphaproteobacteria** war mit einer OTU (ATB-KS-1001) vertreten (Abb. 22). Diese OTU ist verwandt mit dem kultivierten Stamm *Sphingomonas adhaesiva* str. GIFU 11458 [D16146] und mit der Klonsequenz E2aB09 [DQ103610] isoliert aus einem hypersalinen Biofilm (USA) mit einer Sequenzähnlichkeit von 93 % und 97 %.

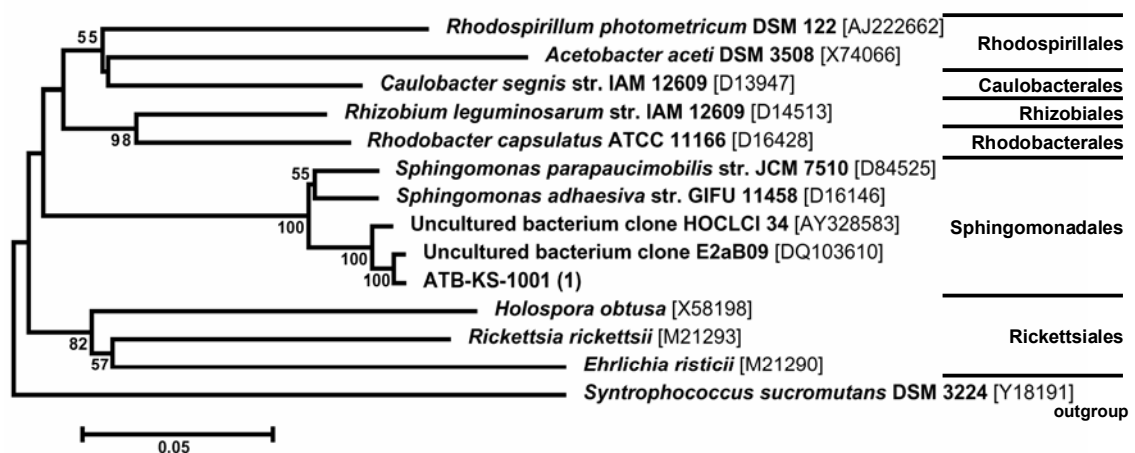


Abb. 22: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Alphaproteobacteria der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Syntrophococcus sucromutans* DSM 3224 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

Vier OTU repräsentativ für zusammen fünf Klone der Bacteria 16S rDNA Bank konnten für die Klasse **Gammaproteobacteria** nachgewiesen werden. Innerhalb dieser Klasse, konnten alle Klone der Ordnung Pseudomonadales zugeordnet werden (Abb. 23).

Die OTU ATB-KS-0970 und ATB-KS-0915 zeigten eine hohe Übereinstimmung von 84 % bzw. 98 % zu Kulturstämmen wie z.B. *Acinetobacter grimontii* str. 17A04 [AF509828] und *Pseudomonas* sp. str. CL-2 [AY017062]. Weitere Ähnlichkeiten ergaben sich wiederum zu verschiedenen 16S rDNA Sequenzen von bislang unkultivierten Mikroorganismen nachgewiesen in verschiedenen Umweltproben. Als Beispiel sei die Zuordnung von OTU ATB-KS-0978 zu der Klonsequenz GZKB112 [AJ853605] isoliert aus Deponiesickerwasser in China genannt.

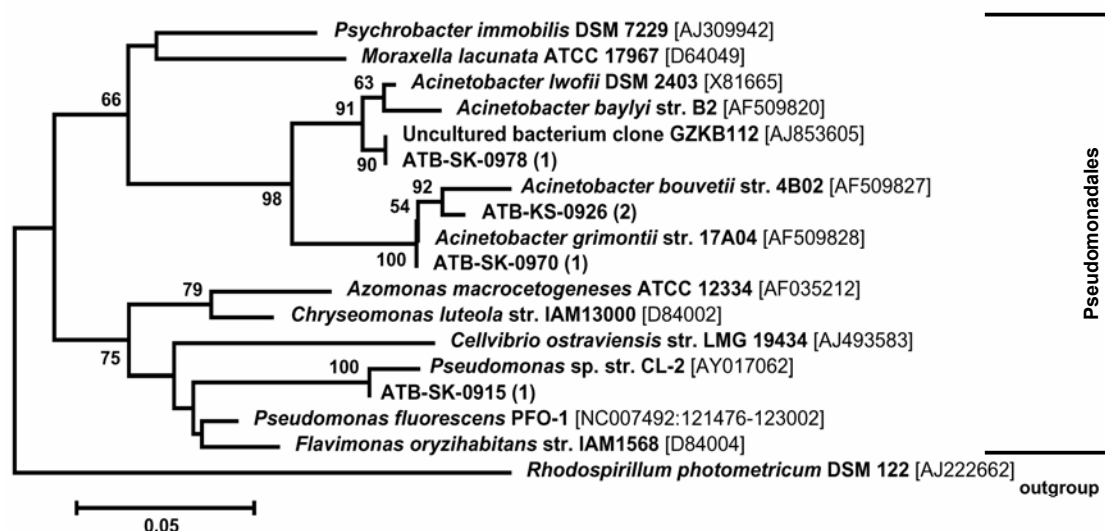


Abb. 23: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Gammaproteobacteria der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

Die einzige OTU ATB-KS-0939 für die Klasse **Deltaproteobacteria** wurde zu der Ordnung Desulfobacterales gruppiert (Abb. 24). Diese OTU zeigte eine große Ähnlichkeit von 90 % und 91 % auf Ebene der 16S rDNA Sequenz zu den Kulturstämmen *Desulfobulbus propionicus* DSM 2032 [AY548789] sowie *Desulfobulbus* sp. str. R004 [AY005037].

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Rhodospirillum photometricum* DSM 122 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.



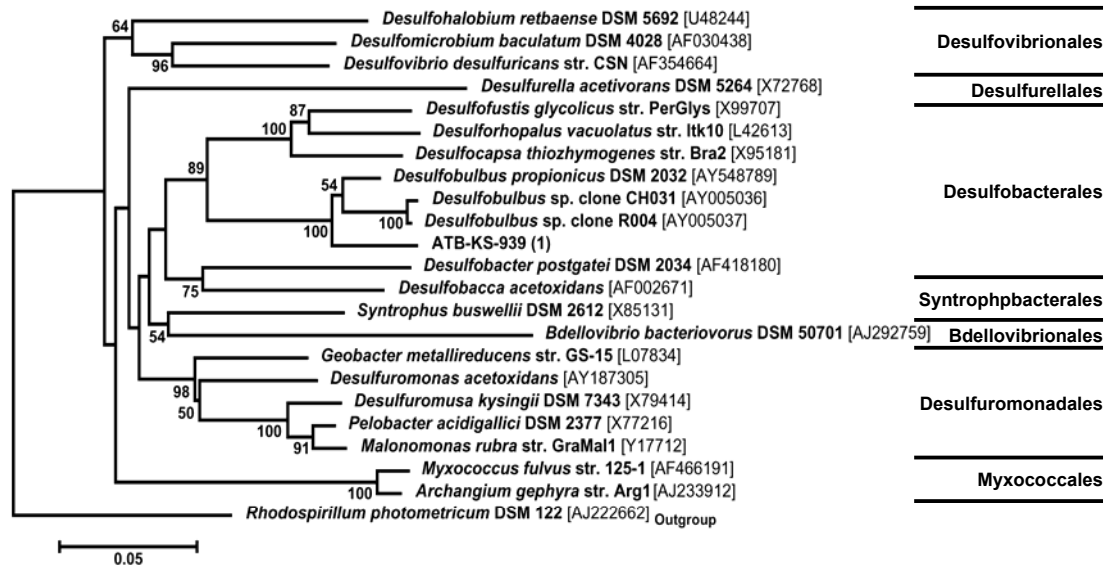


Abb. 24: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Deltaproteobacteria der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

### Phylum Spirochaetes

Für das Phylum Spirochaetes wurde ebenfalls nur eine OTU, ATB-KS-0946, gefunden (Abb. 25). In der phylogenetischen Analyse der 16S rDNA Bacteria Bank konnte diese OTU in Relation zu den Klonen AUSPI67 [AY648566] isoliert aus einem sulfathaltigen Bioreaktor (USA) und zu Klon TANB18 [AY667253] isoliert aus Grundwasser (USA) gesetzt werden. Die Ähnlichkeit der 16S rDNA Nukleotidsequenzen betrug jeweils 81 %. Wie in den vorherigen Beispielen auch handelt es sich bei diesen Sequenzen mit der geringsten genetischen Distanz zu ATB-KS-0946 um Sequenzen von bislang nicht kultivierten Mikroorganismen.

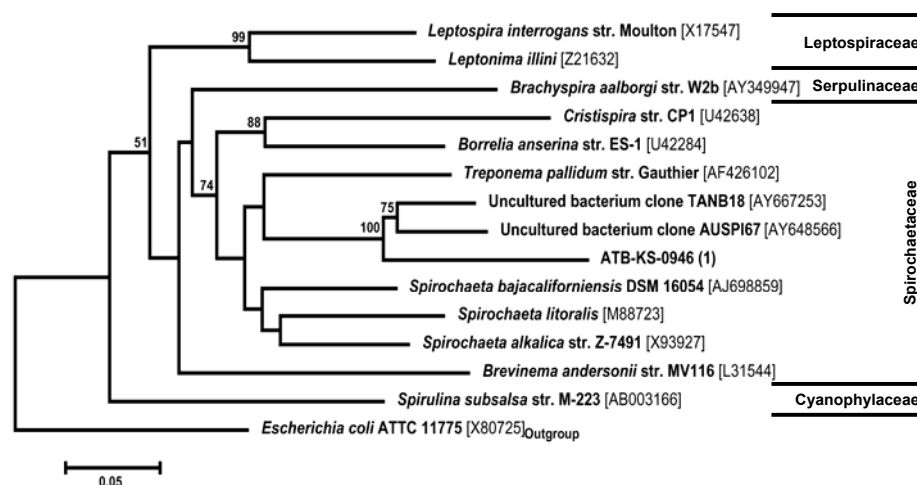


Abb. 25: Phylogenetische Beziehung ATB-KS-Klone innerhalb der Phylum Spirochaetes der Domäne Bacteria.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf einer *neighbor-joining* Analyse von partialen 16S rDNA Sequenzen. *Rhodospirillum photometricum* DSM 122 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

### 4.3 Mikrobielle Diversität in einer biogas-produzierenden zweistufigen Fermentation von Triticale-Silage (Normaler Prozesszustand)

Die ausschließliche Verwendung von Silagen in CSTR- bzw. Rührkesselreaktoren ohne Zusatz von Gülle ist bekanntermaßen mit verschiedenen verfahrenstechnischen Problemen behaftet. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen eines anderen Projektes ein zweistufiger Reaktortyp speziell für die Vergärung von Silagen entwickelt. Dieser Reaktortyp besteht aus drei parallel geschalteten *leach-bed*-Reaktoren (LBR), in welchen die Silage im Aufstrom mit Prozessflüssigkeit durchspült wird. Der Effluent der drei Reaktoren wird gesammelt und in einen Festbett-Anaerobfilter (AF) geleitet, in welchem der Hauptanteil der Methanogenese stattfinden soll. Der Ablauf des AF wiederum wird zurück in die LBR geleitet um ein weiteres Auslaugen der Nährstoffe aus der Silage und, im Fall frisch eingefüllter Silagen, eine Inokkulation der Silage zu gewährleisten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effluent von einem der LBR (Verweilzeit der Silage: 14 Tage) sowie von dem AF beprobt und mittels der zuvor etablierten molekulargenetischen Analytik charakterisiert. Ziel war die Erfassung der mikrobiellen Diversität insbesondere der Verteilung der methanogenen Archaea in dem Reaktor.

#### 4.3.1 Betrieb des Reaktors

Die Biogas-Bildungsrate in dem LBR wurde mit den höchsten Werten zwei Tage nach der Beladung bestimmt. Die Biogasbildung betrug  $210 \text{ l d}^{-1}$ , die volumenspezifische Rate lag bei  $3,0 \text{ l}_{\text{Biogas}} \text{ l}_{\text{Reaktorvolumen}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Der Methangehalt des erzeugten Biogases variierte mit der Verweilzeit der Silage. Er stieg von Werten von weniger als 10 Vol.% zu Beginn der Vergärung auf Werte über 30 Vol.% nach der maximalen Verweilzeit von 14 Tagen.

Die Biogas-Produktion in dem AF wurde stark durch die Beladung der LBR beeinflusst, die mit der Biogas-Produktion resultierend aus der letzten LBR-Füllung korreliert ist. Die Biogas-Produktion betrug 120 bis  $510 \text{ l d}^{-1}$ . Die resultierende volumenspezifische Rate wurde mit  $1,7 \text{ bis } 7,3 \text{ l}_{\text{Biogas}} \text{ l}_{\text{Reaktorvolumen}}^{-1} \text{ d}^{-1}$  berechnet. Der Methangehalt in dem Biogas aus dem AF lag relativ konstant bei  $65,9 \pm 7,8 \text{ Vol.}\%$ .

Ähnlich zu der Biogas-Produktion erreichte die Konzentration von Fettsäuren in dem Effluent aus der Silage in dem LBR den höchsten Wert zwei bis drei Tage nach der Be-

---

<sup>1</sup> *Escherichia coli* ATCC 11775 diente als *outgroup*. Weitere Details wie bei Abb. 17.

ladung mit frischem Silagematerial. Der maximale Wert für die Konzentration von leichtlöslichen kurzkettigen Fettsäuren (*volatile fatty acids*, VFA) wurde mit  $13,7 \text{ g l}^{-1}$  bestimmt. Danach nimmt die Konzentration von VFA ab. Sieben Tage nach Beginn der Vergärung liegen weniger als  $5 \text{ g l}^{-1}$  VFA vor, während der pH von 4,8 auf 6,7 ansteigt.

Die Probennahme aus dem Ablauf aus einem LBR und dem AF erfolgte nach einer Verweilzeit von sieben Tagen nach Beladung mit frischer Triticale-Silage. Die chemischen Parameter in dem Effluent wurden wie folgt bestimmt: Der pH lag bei 7,0 (LBR) bzw. 7,5 (AF). Der Gehalt an VFA (C2-C6) wurde mit  $2,92 \text{ g kg}^{-1}$  (LBR) bzw.  $0,97 \text{ g kg}^{-1}$  (AF) bestimmt.

#### 4.3.2 Analyse der 16S rDNA Bibliotheken

Die Charakterisierung der Archaea-Diversität erfolgte mittels des zuvor entwickelten molekulargenetischen Ansatzes spezifisch für methanogene Archaea.

Hierzu wurden zwei 16S rDNA Bibliotheken, jeweils eine für LBR und AF, konstruiert. Diese zwei 16S rDNA Banken umfassen 137 (LBR) und 168 Klone (AF). Mittels ARDRA konnten in den beiden Banken insgesamt 77 verschiedene OTU detektiert werden (Tab. 5).

**Tab. 5: Übersicht über die in den zwei 16S rDNA Bibliotheken detektierten taxonomischen Gruppen.<sup>1</sup>**

|                            | Stufe 1: Silage-Vergärung<br>(Verweilzeit: 2 Wochen) |                | Stufe 2: Anaerobfilter<br>(kontinuierlicher Betrieb) |                |
|----------------------------|--|----------------|--|----------------|
|                            | OTU  | 16S rDNA Klone | OTU  | 16S rDNA Klone |
| <b>Domäne Archaea</b>      |  |                |  |                |
| Phylum Euryarchaeota       | 23 (100 %)   | 131 (95 %)     | 21 (44 %)  | 134 (78 %)     |
| Ordnung Methanomicrobiales | 14 (48 %)  | 48 (34 %)      | 12 (25 %)  | 48 (28 %)      |
| Ordnung Methanosarcinales  | 4 (14 %)   | 73 (53 %)      | 4 (8 %)  | 75 (44 %)      |
| Ordnung Methanobacteriales | 2 (7 %)  | 4 (3 %)        | 1 (2 %)  | 5 (3 %)        |
| CA 11 Gruppe               | 3 (10 %)   | 6 (4 %)        | 3 (6 %)  | 5 (3 %)        |
| ARC 1 Gruppe               | ND   | ND             | 1 (2 %)  | 1 (1 %)        |
| <b>Domäne Bacteria</b>     |  |                |  |                |
| Phylum Firmicutes          | 2 (7 %)  | 2 (1 %)        | 8 (17 %)   | 10 (6 %)       |
| Phylum Bacteroides         | 1 (3 %)  | 2 (1 %)        | 1 (2 %)  | 1 (1 %)        |
| Phylum Spirochaetes        | 1 (3 %)  | 1 (1 %)        | 2 (4 %)  | 2 (1 %)        |
| Phylum Acidobacteria       | ND   |                | 1 (2 %)  | 2 (1 %)        |
| Phylum Actinobacteria      | ND   |                | ND   |                |
| Phylum Chlamydiae          | ND   |                | 1 (2 %)  | 2 (1 %)        |
| Unklassifizierte Bacteria  | 1 (3 %)  | 1 (1 %)        | 11 (23 %)  | 17 (10 %)      |

<sup>1</sup> Die 16S rDNA Bibliotheken wurden aus Proben der Prozessflüssigkeit von der Silage-Vergärung (Stufe 1) und aus dem Festbett-Anaerobfilter (Stufe 2) entwickelt. Als OTU (*operational taxonomic unit*) wurden individuelle *fingerprint*-Muster der ARDRA gewertet. Für jede OTU ist die Anzahl der entsprechenden Klone in der jeweiligen 16S rDNA Bibliothek aufgeführt. ND = Nicht nachgewiesen.

Von diesen konnten nach Bestimmung der Nukleotidsequenz der klonierten 16S rDNA 30 OTU der Domäne Archaea und hier ausschließlich dem Phylum Euryarchaeota zugeordnet werden.

37 OTU wurden in der phylogenetischen Analyse der 16S rDNA Nukleotidsequenz der Domäne Bacteria zugeordnet. Ein Großteil dieser OTU ließen sich entweder in das Phylum Firmicutes gruppieren oder waren nicht klassifizierbar.

Innerhalb der zwei 16S rDNA Bibliotheken wiesen die Mehrzahl der Klone die ARDRA *fingerprint*-Muster der Archaea-OTU auf.

#### 4.3.2.1 Leach-bed Reaktor (Stufe 1) – Vergärung der Silage

In der Silage-Vergärung innerhalb des *leach-bed* Reaktors (LBR, Laufzeit 2 Wochen) waren alle nachgewiesenen Archaea Vertreter der Ordnungen Methanomicrobiales, Methanosarcinales und Methanobacteriales. Methanococcales wurden nicht detektiert (Abb. 26).

Insgesamt 14 OTU (48 %) repräsentativ für 48 (34 %) Klone wurden der Ordnung Methanomicrobiales zugeordnet. Hierbei zeigten die detektierten OTU stets geringere Übereinstimmungen mit kultivierten Referenzarten, größere Ähnlichkeiten dagegen mit bislang unkultivierten Arten nachgewiesen in verschiedensten Umweltproben durch 16S rDNA Analysen.

Zwei OTU, ATB-KM-3076-B03 (repräsentativ für 15 Klone) und ATB-KM-3125-B26 (repräsentativ für einen Klon), zeigten eine hohe Ähnlichkeit von 93 % und 94 % zu *Methanoculleus bourgensis* DSM 3045 [AY196674].

OTU ATB-KM-3067-B17 zeigte eine große Übereinstimmung mit der Referenzart *Methanospirillum hungatei* str. JF-1 [AY196683] von 91 % und mit dem unkultivierten Klon KA7 [DQ085319] isoliert aus dem Sickerwasser einer Mülldeponie in der Türkei von 97 %.

Viele der Archaea 16S rDNA Sequenzen, welche zu der Ordnung der Methanomicrobiales gruppiert wurden, zeigten größere Sequenzübereinstimmungen nur mit bislang unkultivierten Mikroorganismen nachgewiesen in verschiedenen Umweltproben.

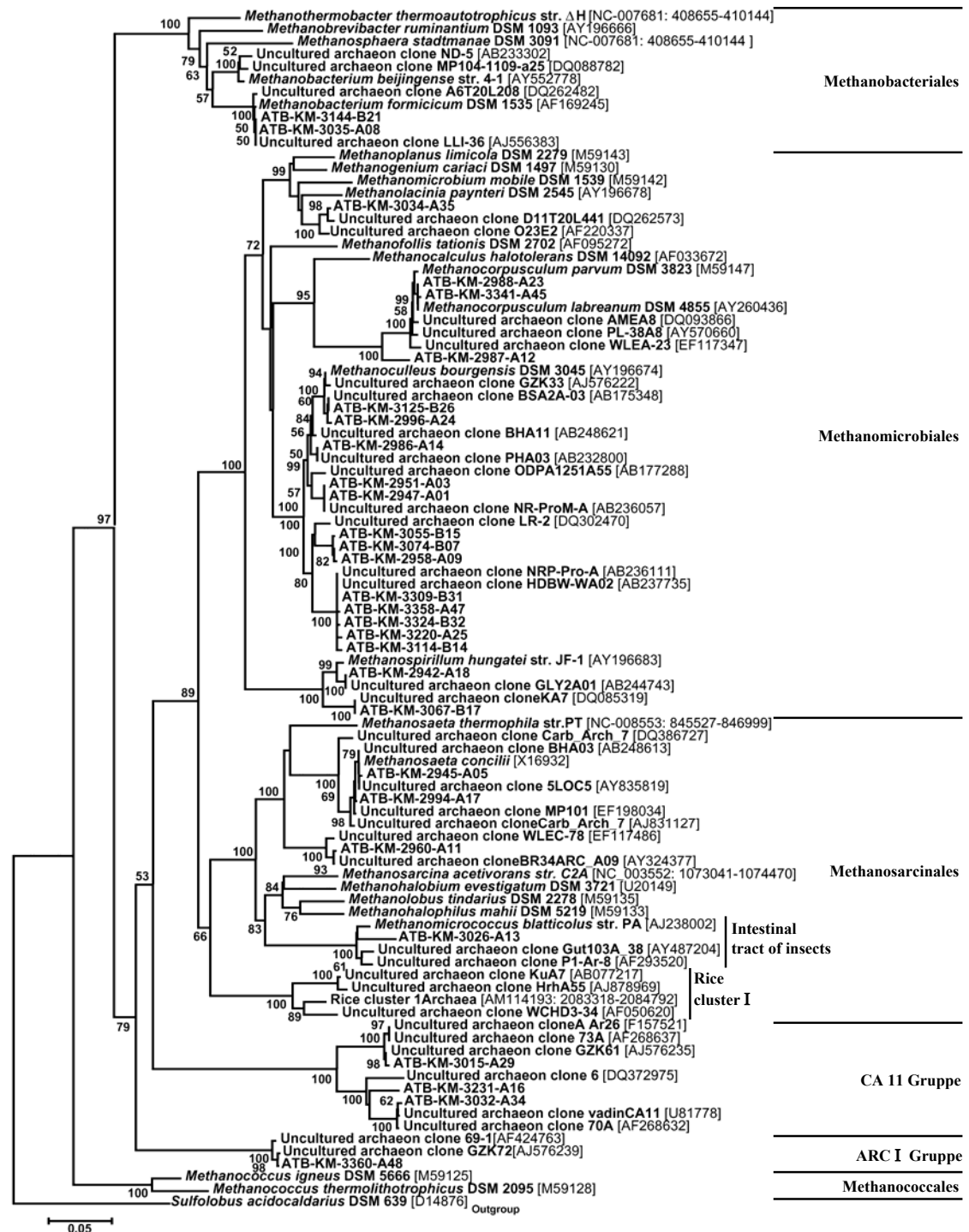


Abb. 26: Phylogenetische Beziehung der ATB-Klone innerhalb des Phylums Euryarchaeota der Domäne Archaea.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Analyse basierte auf der Analyse der Nukleotidsequenz eines ca. 830 bp Fragmentes der 16S rDNA. Die Clusteranalyse erfolgte unter Verwendung des *neighbor-joining* Verfahrens (SAITO & NEI 1987) in Kombination mit dem Substitutionsmodell von Jukes-Cantor (JUKES & CANTOR 1969) und 1000x *bootstrap resampling* (FELSENSTEIN 1985). Die *bootstrap*-Werte sind an den Knoten wiedergegeben, nur *bootstrap*-Werte > 49 % wurden dargestellt. Für Referenz-Nukleotidsequenzen sind die entsprechenden Akzessionsnummern der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006) in eckigen Klammern aufgeführt. *Sulfolobus acidocaldarius* DSM 639 diente als *outgroup*.

Beispielhaft sei hierfür genannt OTU ATB-KM-3125-B26, welcher eine hohe Ähnlichkeit in der Nukleotidsequenz der 16S rDNA mit dem Klon BSA2A-03 [AB175348] isoliert aus einem mesophilen Protein (BSA) vergärenden Reaktor (Japan) aufweist; OTU ATB-KM-3055-B15 und Klon ATB-KM-3074-B07, welche mit dem Klon LR-2 [DQ302470] isoliert aus sodahaltigem See in Indien gruppiert wurden OTU ATB-KM-3309-B31, welcher mit dem Klon HDBW-WA02 [AB237735] isoliert aus dem japanischem Grundwasser große Ähnlichkeit aufwies sowie OTU ATB-KM-3324-B32, der ähnlich war mit dem Klon NRP-Pro-A [AB236111] nachgewiesen in dem anaeroben Boden eines japanischen Reisfeldes.

Für die Ordnung *Methanobacteriales* wurden zwei OTU, ATB-KM-3144-B21 und ATB-KM-2957-B2 detektiert, jeweils repräsentativ für zwei Klone in der 16S rDNA Bank. Die OTU ATB-KM-3144-B21 zeigte eine sehr hohe Ähnlichkeit zu der Kultur *Methanobacterium formicicum* DSM 1535 [AF169245] von 99 %. Die OTU ATB-KM-2957-B2 konnte mit der Nukleotidsequenz von Klon A6T20L208 gruppiert werden (Sequenzähnlichkeit 70 %), welcher aus einer indischen Biogasanlage isoliert wurde [DQ262482].

Vier OTU repräsentativ für insgesamt 73 Klone wurden zu der Ordnung *Methanosarcinales* gruppiert. Die OTU ATB-KM-2930-B01 als Repräsentant für die Mehrheit der Klone in der 16S rDNA Bank (36 Klone) zeigte eine große Sequenzübereinstimmung von 99 % mit der Referenzart *Methanosaeta concilii* [X16932]. Weiterhin ergaben sich auch hier hohe Übereinstimmungen mit klonierten 16S rDNA Sequenzen von bislang unkultivierten Mikroorganismen aus Umweltproben wie z.B. zu Klon BHA03 [Ab248613] isoliert aus einem mesophil betriebenen butyrat-degradierenden Anaerobreaktor (Nukleotidsequenzähnlichkeit 99 %) oder zu Klon 5LOC5[AY835819] nachgewiesen in anaerobem granulösem Schlamm (Nukleotidsequenzähnlichkeit 99 %). Eine weitere OTU, ATB-KM-2933-B09 (repräsentativ für 19 Klone), zeigte begrenzte Ähnlichkeiten zu dem Kulturstamm *Methanosaeta thermophila* str. PT [NC\_008553: 845527-846999 bp]. Neben den OTU verwandt zu *Methanosaeta* sp. wurden auch andere Vertreter der Ordnung *Methanosarcinales* nachgewiesen. Eine OTU, ATB-KM-3026-A13, konnte in Beziehung mit dem kultivierten Stamm *Methanomicrococcus blatticolus* str. PA [AJ238002] gesetzt werden. *Methanomicrococcus blatticolus* str. PA ist Bestandteil der Darmflora von Cellulose verwertenden Insekten. In enge Verwandtschaft gesetzt werden konnten ebenfalls verschiedene Klonsequenzen, welche ebenfalls aus dem Gastrointestinaltrakt verschiedener Insekten isoliert wurden, wie z.B. Klon

Gut103A [AY487204] isoliert aus der Termite *Cubitermes fungifaber* oder Klon P1-Ar-8 [AF293520] isoliert aus einer anderen Termitenart, *Cubitermes orthognathus*. Diese OTU wurde bei insgesamt 9 (= 7 %) Klonen der 16S rDNA Bank nachgewiesen. Innerhalb der neuen taxonomischen Gruppe CA-11 (Godon et al. 1997) konnten mit 3 OTU entsprechend 6 Klone detektiert werden. Diese 16S rDNA Sequenzen wurden mit Klon 6 [DQ372975] isoliert aus dem anaeroben Bereich einer Pilzkultur (China), Klon GZK61 [AJ576235] isoliert aus Deponie-Sickerwasser (China) und Klon Ar26 [AF157521] isoliert aus einem Lager für Schweinejauche (USA) gruppiert.

Keine OTU wurde für die zweite neue taxonomischen Ordnung ARC-I (CHOUARI ET AL. 2005) nachgewiesen.

#### 4.3.2.2 Festbett-Anaerobfilter (Stufe 2) – Methanogenese-Stufe

Wie in dem *leach-bed*-Reaktor konnte in dem Anaerobfilter eine große Anzahl sowie eine hohe Diversität an verschiedenen Archaea nachgewiesen werden.

Die größte Anzahl an OTU, nämlich 12 (25 % der archaellen OTU in der 16S rDNA Bibliothek) und repräsentativ für zusammen 48 Klone (28 % aller archaellen Klone in der 16S rDNA Bibliothek) in der 16S rDNA Bank, konnten der Ordnung *Methanomicrobiales* zugeordnet werden. Diese OTU ließen sich in einen Cluster mit den kultivierten Stämmen *Methanolacinia paynteri* DSM 2545 [AY196678], *Methanocurpusculum labeanum* DSM 4855 [AY260436] und *Methanospirillum hungatei* JF-1 [AY196683] gruppieren.

Wie zuvor ließen sich große Übereinstimmungen mit unkultivierten Stämmen aus Umweltproben finden. Als Beispiele hierfür seien folgende Relationen genannt: OTU ATB-KM-3034-A07 zu Klon O23E2 [AF220337] isoliert aus hypertermophilen Ölreservoir (USA), OTU ATB-KM-2988-A23 und ATB-KM-3341-A45 zu Klon PL-38A8 [AY570660] isoliert aus mesophilem Ölreservoir (Canada), OTU ATB-KM-2987-A12 zu Klon GZK33 [AJ576222] isoliert aus Mülldeponie (China), OTU ATB-KM-2951-A03 zu Klon ODP1251A55 [AB177288] isoliert aus Ozean-Sediment (Pazifik) sowie OTU ATB-KM-2947-A01 zu Klon NR-ProM-A [AB236057] isoliert aus Reisfeldeböden (Japan). Vier OTU konnten in der phylogenetischen Analyse mit Vertretern der Ordnung *Methanosarcinales* gruppiert werden. Sie sind repräsentativ für zusammen 75 Klone (56 %) in der 16S rDNA Bibliothek, wovon 50 Klone alleine von der OTU ATB-

KM-2945-A05 repräsentiert wurden. Diese OTU zeigt höchste Ähnlichkeiten zu *Methanosaeta concilii*.

Innerhalb der Ordnung Methanosarcinales konnte eine OTU (ATB-KM-2960-A11) mit Vertretern der endosymbiotischen Darmflora von cellulose-verwertenden Insekten wie *Methanomicrococcus blatticolus* str. PA [AJ238002], Klon Gut103A [AY487204] isoliert aus der Termiten (*Cubitermes fungifaber*) oder Klon P1-Ar-8 [AF293520] isoliert ebenfalls aus einer Termiten (*Cubitermes orthognathus*) gruppiert werden. Das Vorkommen dieser OTU scheint allerdings nicht auf den Intestinaltrakt von Insekten beschränkt zu sein: Höhere Ähnlichkeiten ergaben sich ebenfalls zu Nukleotidsequenzen, welche in anaeroben Reisfeldeböden (Klon NRP-Pro-A [AB236111]) oder in Mülldeponie-Sickerwasser (Klon Carb Arch 7 [AJ831127]) detektiert wurden. OTU ATB-KM-2960-A11 wurde bei 6 Klonen der 16S rDNA Bank gefunden.

Die Ordnung Methanobacteriales wurde repräsentiert durch eine einzige OTU, ATB-KM-3035-A08. Diese OTU in der phylogenetischen Analyse hat eine große Ähnlichkeit von 99 % mit der Stammkultur *Methanobacterium formicium* DSM 1535 [AF169245] aber ebenso zu dem 16S rDNA Klon eines unbekannten Stammes LLI-36 [AJ556383] isoliert aus einer Flusssandbank (Niederlande).

Die Ordnung Methanococcales konnte mit keiner OTU bzw. bei keinem Klon in der 16S rDNA Bibliothek für den Anaerobfilter nachgewiesen werden.

Dagegen konnten zwei neue taxonomische Gruppen, zu welchen bislang keine Typenstämmen vorliegen, detektiert werden. Entsprechend der Nomenklatur der Erstautoren werden im Folgenden diese Gruppen als CA-11 (GODON ET AL. 1997) und ARC-I (CHOUARI ET AL. 2005) aufgeführt.

Die Gruppe CA-11 konnte mit drei OTU entsprechend fünf Klonen der 16S rDNA Bank nachgewiesen werden. Diese 16S rDNA Sequenzen wurden mit Klon GZK61 [AJ576235] isoliert aus Deponie-Sickerwasser in China und Klon vadinCA11 [U81778] isoliert aus den Rückständen aus der Weindestillation in Frankreich gruppiert.

Die zweite neue Linie ARC I war mit nur einer OTU (ATB-KM-3360-A48) in der 16S rDNA Bank des Anaerobfilters vertreten. Hierbei trat eine große Sequenzähnlichkeit von 99 % zu unkultivierten Klonen auf, wie z.B. zu Klon GZK72 [AJ576239] ebenfalls isoliert aus Deponie-Sickerwasser und zu Klon 69-1 [AF424763] isoliert aus kommunalem Abwasser in den USA.



#### 4.4 Der Vergleich der detektierten Archaea OTU innerhalb der untersuchten Biogasreaktoren (CSTR im Normal- und Übersäuerungs-Zustand, zweistufiges Reaktorsystem)

Die Diversität und die Häufigkeit der detektierten Archaea-OTU in den verschiedenen, im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Biogasreaktoren ist in Tab. 6 zusammenfassend dargestellt. Als dominierende OTU in den 16S rDNA Bibliotheken aus dem zweiphasigem Reaktor (LBR und AF) wurden OTU aus der Ordnung Methanosarcinales gefunden.

**Tab. 6: Häufigkeit der detektierten Archaea OTU innerhalb der untersuchten Biogasreaktoren.<sup>1</sup>**

| Taxonom. Ordnung   | Detektierte OTU    | Identische OTU  | Klone in der 16S rDNA Bibliothek |            |                        |      |                                   |      |                      |      |   |    |
|--------------------|--------------------|-----------------|----------------------------------|------------|------------------------|------|-----------------------------------|------|----------------------|------|---|----|
|                    |                    |                 | CSTR<br>(Normaler<br>Zustand)    |            | CSTR<br>(Übersäuerung) |      | LBR<br>(Verweilzeit:<br>2 Wochen) |      | AF<br>(Dauerbetrieb) |      |   |    |
| Methanosarcinales  | ATB-KM-2945-A05    | ATB-KS-077      |                                  | ND         |                        | ND   | 36                                | 27%  | 50                   | 37%  |   |    |
|                    | ATB-KM-2994-A17    |                 |                                  | ND         | 19                     | 15%  | 13                                | 10%  |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2960-A11    |                 | 4                                | 6%         | 9                      | 7%   | 6                                 | 4%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3026-A13    |                 |                                  | ND         | 9                      | 7%   | 6                                 | 4%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-170         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-088         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-162         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
| Methanomicrobiales | ATB-KM-2988-A23    | ATB-KS-141      |                                  | ND         |                        | ND   | 6                                 | 5%   | 10                   | 7%   |   |    |
|                    | ATB-KM-3220-A25    |                 |                                  | ND         | 7                      | 5%   | 7                                 | 5%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2987-A12    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   | 7                                 | 5%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2986-A14    |                 |                                  | ND         |                        | ND   | 6                                 | 4%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2947-A01    |                 |                                  | ND         | 2                      | 2%   | 5                                 | 4%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2958-A09    |                 |                                  | ND         |                        | ND   | 4                                 | 3%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2942-A18    |                 |                                  | ND         |                        | ND   | 3                                 | 2%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2951-A03    |                 |                                  | ND         | 2                      | 2%   | 2                                 | 1%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-2996-A24    |                 |                                  | ND         |                        | ND   | 1                                 | 1%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3341-A25    |                 |                                  | ND         |                        | ND   | 1                                 | 1%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3358-A47    |                 |                                  | ND         |                        | ND   | 1                                 | 1%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3034-A35    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   | 1                                 | 1%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3076-B03    |                 |                                  | ND         | 15                     | 11%  |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3074-B07    |                 | 6                                | 9%         | 8                      | 6%   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3114-B14    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3055-B15    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3067-B17    |                 | 24                               | 35%        | 1                      | 1%   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3125-B26    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3324-B32    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-076         |                 | 22                               | 32%        |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-078         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-151         |                 | 2                                | 3%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-156         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-188         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-221         |                 | 1                                | 2%         |                        | ND   |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-441         |                 |                                  | ND         | 2                      | 80%  |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-465         |                 |                                  | ND         | 1                      | 20%  |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-468         |                 |                                  | ND         | 1                      | 20%  |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KS-470         |                 |                                  | ND         | 1                      | 20%  |                                   | ND   |                      |      |   |    |
|                    | Methanobacteriales |                 | ATB-KM-3035-A08                  | ATB-KS-155 |                        | ND   |                                   | ND   | 2                    | 2%   | 5 | 4% |
|                    |                    |                 | ATB-KM-3144-B21                  |            |                        | ND   | 2                                 | 2%   |                      | ND   |   |    |
|                    |                    |                 | ATB-KS-152                       |            | 1                      | 2%   |                                   | ND   |                      | ND   |   |    |
|                    |                    |                 | ATB-KS-155                       |            | 2                      | 3%   |                                   | ND   |                      | ND   |   |    |
| CA-11 group        | ATB-KM-3231-A16    | ATB-KM-3015-A29 |                                  | ND         |                        | ND   | 3                                 | 2%   | 3                    | 2%   |   |    |
|                    | ATB-KM-3032-A34    |                 |                                  | ND         | 2                      | 2%   | 1                                 | 1%   |                      |      |   |    |
|                    | ATB-KM-3015-A29    |                 |                                  | ND         | 1                      | 1%   | 1                                 | 1%   |                      |      |   |    |
| ARC-I group        | ATB-KM-3360-A48    |                 | ND                               |            | ND                     |      | ND                                | 1    | 1%                   |      |   |    |
| Archaea            | Total              |                 | 68                               | 100%       | 5                      | 100% | 131                               | 100% | 134                  | 100% |   |    |

Diese OTU (ATB-KM-2945-A05, ATB-KM-2994-A17) waren engverwandte mit der acetat-verwertenden Art *Methanosaeta concilii*. Diese OTU konnten nicht in den unter-

<sup>1</sup> Für jede OTU ist die Anzahl der entsprechenden Klone in der jeweiligen 16S rDNA Bibliothek aufgeführt. ND = Nicht nachgewiesen.

suchten CSTR nachgewiesen werden. In dem CSTR bei einem normalen Betriebszustand wurde als häufigster Vertreter der Ordnung Methanosarcinales die OTU ATB-KM-2960-A11 gefunden, welche ebenfalls zu der Gattung *Methanosaeta* zu zählen ist, jedoch in der phylogenetischen Auswertung deutliche Unterschiede zu *Methanosaeta concilli* wie auch zu *Methanosaeta thermophila* zeigte. Diese OTU wurde ebenfalls in dem zweiphasigem System nachgewiesen, allerdings mit wesentlich geringeren Anteilen innerhalb der 16S rDNA Banken als die vorgenannten OTU verwandt mit *Methanosaeta concilli*. Als dominierende OTU in dem CSTR im Normalzustand wurde die OTU ATB-KM-3067-B17 gefunden (35 % der Klone der 16S rDNA Bank). Diese OTU konnte mit Verwandtschaft zu der  $H_2/CO_2$ /Formiat konsumierenden Art *Methanospirillum hungatei* (Ordnung Methanomicrobiales) gebracht werden; allerdings wies die detektierte OTU eine größere genetische Distanz zu dem Referenzstamm auf. In dem zweiphasigen System wurde diese OTU nur in dem silage-vergärenden LBR gefunden, und hier auch nur in einem einzigen Klon. Als zweite OTU mit höheren Anteilen unter den 16S rDNA Klonen (32 %) aus dem CSTR wurde die OTU ATB-KS-076 ermittelt. Diese OTU konnte mit der ebenfalls hydrogenotrophen Art *Methanoculleus bourgensis* gruppiert werden. Trotz der hohen Diversität an OTU verwandt mit *Methanoculleus* sp. (14 OTU von 29) in dem zweiphasigem Reaktor konnte diese OTU in dem zweiphasigem Reaktor nicht nachgewiesen werden.

In dem CSTR nach Eintritt einer starken Versäuerung waren keine der in den anderen Reaktoren detektierten OTU mehr nachzuweisen. Es fanden sich weder die in den 16S rDNA Banken häufig auftretenden OTU noch Vertreter von nur vereinzelt detektierten OTU. In diesem CSTR konnten nur vergleichsweise wenige OTU nachgewiesen werden, welche in keinem der anderen untersuchten Reaktoren gefunden wurden. So wurden drei OTU (ATB-KS 441, ATB-KS 465, ATB-KS 470) gefunden, welche Übereinstimmungen mit der mit der  $H_2/CO_2$ /Formiat aber auch Propanol oder Butanol verwertenden Art *Methanocorpusculum parvum* zeigten. Eine weitere, vereinzelt in dem übersäuerten CSTR detektierte OTU, ATB-KS 468, ließ sich mit der bereits in den anderen Biogasreaktoren nachgewiesenen hydrogenotrophen Art *Methanoculleus bourgensis* gruppieren. Der ARDRA-fingerprint sowie die Nukleotidsequenz dieser OTU weisen aber Unterschiede zu den in den anderen Reaktoren gefunden *Methanoculleus*-OTU auf. Die taxonomisch bislang nicht näher klassifizierten Gruppen CA-11 und ARC-I waren mit vier OTU nur in dem zweiphasigen Reaktor vertreten; keiner dieser OTU wurde in dem CSTR weder im Normalzustand noch nach der Übersäuerung nachgewiesen.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Methodische Aspekte**

#### **5.1.1 Eignung der molekularen Analyse zur Untersuchung der mikrobiellen Diversität**

Die molekularen Methoden, welche in dieser Arbeit angewandt wurden, zeigten eine große Effizienz. Trotzdem gibt es verschiedene potentielle systematische Fehler innerhalb dieser Analysen.

##### *5.1.1.1 DNA-Isolierung und Reinigung*

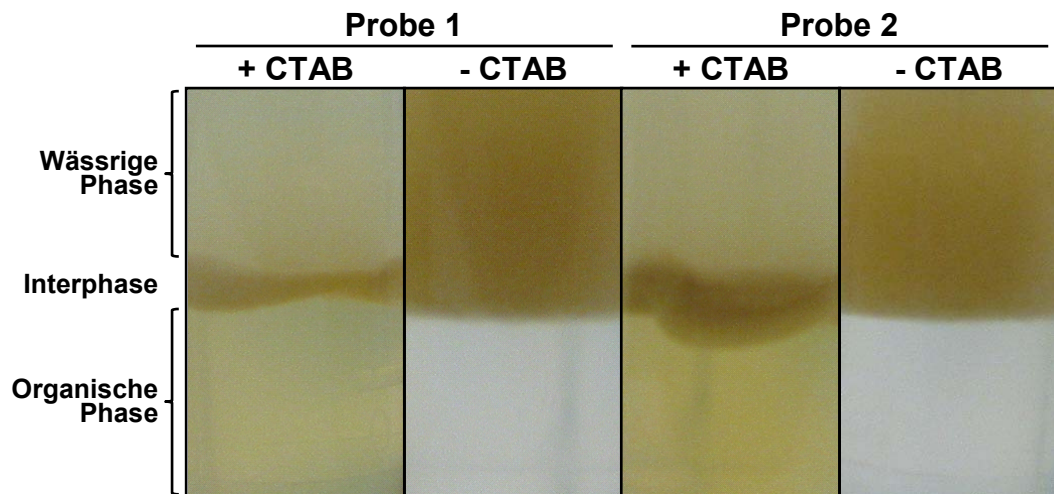
Die in Proben von Biogasreaktoren meist in hohen Mengen vorkommenden phenolischen Substanzen, Huminsäuren und Schwermetalle (WILSON 1997) kontaminieren die isolierte DNA, so dass diese für eine weitere Aufarbeitung (z.B. mit Enzymen) meist ungeeignet ist.

Aus der großen Anzahl möglicher DNA-Extraktionsmethoden muss für eine spezielle Anwendung jeweils die geeignete ausgesucht und für die verwendete Umweltprobe optimiert werden. Die Methoden, die zur Aufreinigung von DNA aus Biogasreaktorproben etabliert wurden und zum Teil heute sogar kommerziell erhältlich sind, können jedoch unter Umständen eine starke Fragmentierung der DNA verursachen.

Zur DNA-Extraktion können grundsätzlich verschiedene Methoden angewendet werden. Die mechanische Lyse von Bakterien mit Glas- oder Zirkoniumkügelchen (*beads*) mittels einem *beadbeater* wird von mehreren Autoren beschrieben (COLLINS ET AL. 1993; BLEUMINK-PLUYM ET AL. 1994; CHALLANS ET AL. 1994). Die Bakteriensuspension wird dabei mit den *beads* gemischt und in einem *beadbeater* für einige Minuten bei einer Frequenz von 100 Hz kräftig geschüttelt. Die Zellwände werden so zerstört und die DNA freigesetzt. Auch alleiniges Kochen der Suspension für 15 Minuten (MOSS ET AL. 1997) bzw. 20 Minuten (HURLEY ET AL. 1987) setzte geeignete DNA zur Verwendung für die PCR frei. Eine andere Methode zum Zellaufschluss basiert auf einem enzymatischen Prozess. Hierzu werden Enzyme wie Subtilisin und/oder Lysozym sowie Proteinase und SDS (= Detergent) eingesetzt (VISUVANATHAN ET AL. 1989). Auch die enzymatische Methode mit Lysozym und Proteinase K (in Verbindung mit Cäsiumchloridbehandlung und Zugabe von 30 Volumina destilliertes Wasser, um durch osmotischen Schock die Zellwände zu sprengen) ergab eine Ausbeute von 1,2-2 mg DNA/g Zellfeuchtgewicht (BOSE ET AL. 1993).

Bei den verschiedenen Zellaufschlusstechniken bleibt aber häufig das Problem, dass mit der DNA auch mögliche PCR-inhibierende Substanzen extrahiert werden. Somit ist meist eine zusätzliche Reinigung der DNA unumgänglich, wenn diese für weiterführende molekulargenetische Analysen eingesetzt werden soll.

Zur DNA-Reinigung ist die Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wie Chloroform und Phenol die klassische Methode (SAMBROCK & RUSSELL 2001). Die hydrophilen DNA-Moleküle reichern sich in der wässrigen Phase an und können aus dieser zurückgewonnen werden (Abb. 27).



**Abb. 27:** Der Effekt von CTAB bei der Reinigung von DNA aus Probenmaterial aus einem Biogasreaktor.<sup>1</sup>

Die Präzipitation der gelösten DNA erfolgt mit Hilfe von Ethanol (KAMBOURIS ET AL. 1996). Eine weitere Reinigungsmethode bei der Isolierung von Bakterien-DNA bedient sich dem Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) (HOLBEN ET AL. 1988). Das unlösliche PVPP soll Huminsäuren und andere phenolische Verunreinigungen durch Adsorption binden. PICARD ET AL. (1992) verwendete PVPP direkt im Lysepuffer. SOUTHERN ET AL. (1975) setzte zur DNA-Reinigung die Gelelektrophorese ein. Hierbei wurde die aus Bodenproben isolierte DNA in einem Gel, bestehend aus 1,25 % Low Melting Ultra Pure Agarose (LMP) mit 2 % Polyvinylpyrrolidon (PVP) über Nacht gereinigt. Der DNA-Reinigung mit PVPP sind allerdings in Hinblick auf die Höhe der Hemmstoffkonzentration Grenzen gesetzt. PVPP alleine kann hohe Mengen an Huminsäuren (GOODYEAR ET AL., 1994) und andere PCR-Inhibitoren (TEBBE & VHJEN, 1993) jedoch nicht effizient entfernen.

<sup>1</sup> Nach Zugabe von CTAB unter Hochsalz-Bedingungen ist während der Extraktion mit Chloroform eine Braunfärbung der organischen Phase zu beobachten, welches auf eine Auswaschung der Huminsäuren schließen lässt.

Eine weitere Reinigung kann durch Zugabe des kationischen Detergents Cetyltrimethylammoniumbromid (CTAB) erzielt werden. CTAB wurde in verschiedenen Arbeiten erfolgreich zur Entfernung von Polysaccharidverunreinigungen in DNA-Lösungen eingesetzt (RALPH & BELLAMY 1964; HILL ET AL. 1972). CTAB findet als Komplexbildner und Detergenz Verwendung. Er bildet dann bei niedrigen Salzkonzentrationen einen Komplex mit der DNA. Dagegen formt CTAB bei hohen Salzkonzentrationen ( $> 0,7 \text{ M NaCl}$ ) mit sauren Polysacchariden und anderen PCR-Inhibitoren (z.B. Pigmenten) einen Komplex, der durch eine folgende Chloroformextraktion ausgewaschen wird (JONES & WALKER, 1963; WILSON, 1997). Die DNA verbleibt in der wässrigen Phase, wird dann mittels Isopropanol gefällt und besitzt für weiterführende Analysetechniken, wie der PCR, die benötigte Qualität (KLOCKE ET AL. 2007). Die CTAB-Methode wurde von BRETER ET AL. bereits 1977 für die DNA-Isolierung von Proben aus einem aquatischen Milieu eingeführt und von KARL & BAILIFF (1989) weiterentwickelt. Von HONORE-BOUAKLINE ET AL. (2003) wurde das CTAB-Verfahren auch im medizinischen Bereich angewendet. Hierbei zeigte diese Methode eine sehr ideale DNA-Vorbereitung für eine effiziente PCR-Amplifikation, die für eine schnelle medizinische Diagnostik sehr hilfreich war.

Für die Extraktion der DNA aus Biogasreaktoren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll entwickelt, das auf einer Methode von RHEIMS & STACKEBRANDT (1999) basiert. Die Untersuchungen ergaben, dass die Verwendung von CTAB notwendig wurde, um PCR-amplifizierbare DNA zu erhalten. In einem Protokoll ohne CTAB wurde aus Biogasreaktorproben qualitativ schlechte oder unsaubere DNA extrahiert, so dass kein Signal in der PCR zu sehen war. Der Grund hierfür könnte darin liegen, dass die Proben aus Biogasreaktoren eine sehr hohe Akkumulation an PCR-Inhibitoren wie Huminsäuren besitzen. Nur bei einem Einsatz von CTAB konnten klare DNA-Banden und reproduzierbare Resultate mit amplifizierbarer DNA erzielt werden (Abb. 28).

Insgesamt bildet das in dieser Arbeit vorgestellte Protokoll zur Isolierung und Reinigung von DNA eine zuverlässige, preiswerte und recht schnelle Möglichkeit, um klonierungsfähige DNA aus Umweltproben zu extrahieren.

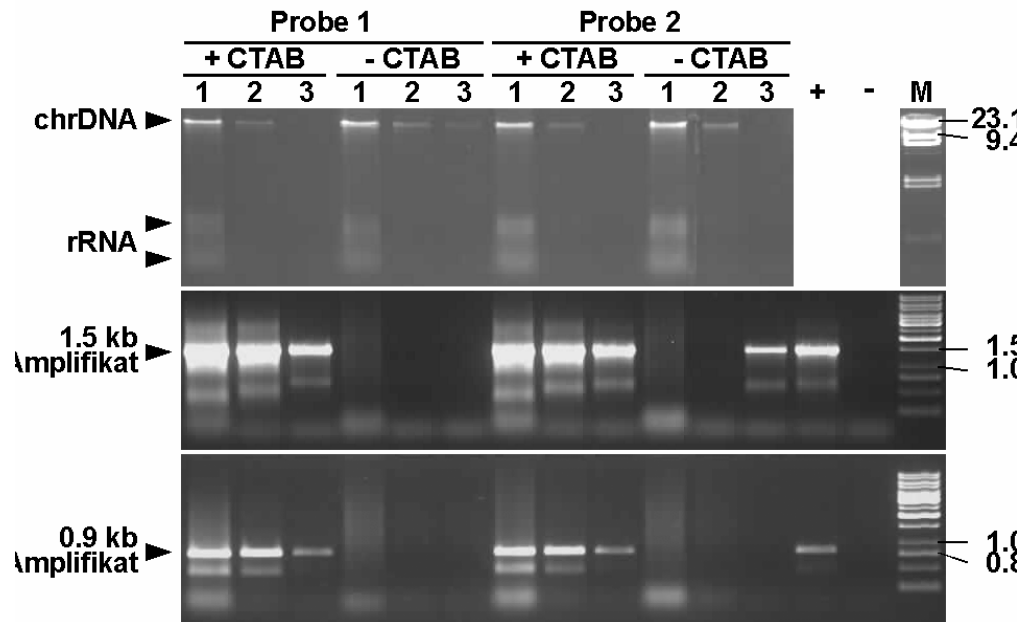


Abb. 28: Eignung der unter Verwendung von CTAB gereinigten DNA<sup>1</sup> für die PCR.<sup>2</sup>

### 5.1.2 Selektivität der Primer

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine weit verbreitete Technik zur selektiven Vermehrung und damit zum Nachweis von DNA-Sequenzen. Sie erleichtert die Detektion von einzelnen Mikroorganismen in allen Habitaten. Ebenso ist diese Methode etabliert für eine Abschätzung bzw. Untersuchung der mikrobiellen Diversität.

Die Selektivität der PCR beruht auf der Selektivität der Oligonukleotide („Primer“), welche als Startpunkte für die Verdoppelung der DNA in der Probe dienen („Template“). Eine Vielzahl von möglichen Primer-Kombinationen wurde zur selektiven Anreicherung der mikrobiellen 16S rDNA Sequenz bzw. der 16S rDNA von verschiedenen mikrobiellen Gruppen publiziert (GIOVANNONI ET AL. 1990, DE LONG ET AL. 2005, DASSARMA & FLEISCHMANN. 1995, WATANABE ET AL. 2001).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Primer-Kombinationen zum spezifischen Nachweis von methanogenen Archaea (Arche2F-ARC934R) und der bakteriellen Begleitflora (16Sforw-16Srev) genutzt. Die Länge der als Primer verwendeten Oligonukleotide liegt bei jeweils ca. 20 bp.

<sup>1</sup> Vgl. Abb. 27.

<sup>2</sup> (A) Für die PCR eingesetzte DNA, (B) PCR-Produkte bei Verwendung von Primern für die bakterielle 16S rDNA (theoretisch erwartete Länge: 1500 bp), (C) PCR-Produkte bei Verwendung von Primern für die archaelle 16S rDNA (theoretisch erwartete Länge: 900 bp), (1, 2, 3) Verdünnungsreihe der DNA, (+) Positiv-Kontrolle, (-) Negativ-Kontrolle ohne DNA Template, (M) Längenstandard.

### 5.1.2.1 PCR-Primer zum Nachweis von Archaea

Mit der für Archaea selektiven Primerkombination Arch2F (= 69Fmod) / ARC934R wurden insgesamt vier 16S rDNA Bibliotheken konstruiert. Die anhand der aus Reaktorproben isolierten DNA erzeugten PCR-Produkte hatten eine Grösse von ca. 800 bis 900 bp. Durch die Beschränkung auf einen Teil der ca. 1500 bp 16S rDNA Sequenz wird die vollständige Sequenzierung des Amplifikates innerhalb einer einzigen Sequenzierungsreaktion möglich. Durch die Klonierung in einen Standardvektor (z.B. pGEM-T) mit Bindungsstellen für Standardsequenzierprimern (z.B. T7 Promoter Sequenz) in Nähe der Klonierungsstelle kann die Sequenzierung unter standardisierten Bedingungen durchgeführt werden, welches sowohl den Arbeitsaufwand wie auch die anfallenden Kosten minimiert.

Die erfasste Nukleotidsequenz mit einer Grösse von ca. 800 bp bis 850 bp für die archaelle 16S rDNA enthält sowohl hochkonservierte Bereiche als auch variable Bereiche mit einer für eine taxonomischen Einordnung ausreichender Länge.

Der in dieser Arbeit erstmals verwendete Primer Arche2F beruht auf einem konservierten Bereich innerhalb der archaellen 16S rDNA, welcher bereits in verschiedenen Arbeiten (DE LONG 1992, FERNANDEZ ET AL. 1999) zur Ableitung spezifischer Primer (69F) verwendet wurde. Im Unterschied zu dem Primer 69F ist der Primer Arche2F (bzw. 69Fmod) um vier Nukleotide in 5'-Richtung verlängert worden. Dafür konnte der modifizierte Primer um sechs Nukleotide an dem 3'-Ende verkürzt werden (Abb. 29).

|  | Primer 69F             | TAAGCCATGCRAGTCGAAYG                                     |
|--|------------------------|--|
|  | Primer Arche2F(69Fmod) | YGAYTAAGCCATGCRAGT                                       |
| <i>Methanococcus jannaschii</i> [M59126]               | 5'-CCACTGCTATCGGGGTC   | CGACTAAGCCATGCGAGTCAAGGGGCTCCCTT---CGGGGAGCACCGGCG-3'    |
| <i>Methanococcus maripaludis</i> [U38487]              | 5'-CCACTGCTATTGGGATT   | CGACTAAGCCATGCGAGTCTATGG---NNTTT---CGGC---CATGGCG-3'     |
| <i>Methanothermus fervidus</i> [M59145]                | 5'-CCACTGCTATGGGGTTC   | CGACTAAGCCATGCAAGTCAAGCG---GGCCT---TGNTNA---CGTGGCG-3'   |
| <i>Methanobacterium formicicum</i> [AF169245]          | 5'-CCACTGCTATTGGGTTT   | CGATTAAAGCCATGCAAGTCAAGCG---ATCCTT---CGGGGT---CGTGGCG-3' |
| <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> [AY196660] | 5'-CTACTGCTATTGGGGTT   | CGATTAAAGCCATGCAAGTCAAGCG---AACCT---TGTGTT---CGTGGCGA-3' |
| <i>Methanoculleus bourgense</i> [AY196674]             | 5'-TCACTGCTATCGGGGTT   | CGATTAAAGCCATGCGAGTCAAGAG---GGTT---CGCC---CTCGGCG-3'     |
| <i>Methanofollis tationis</i> [AF095272]               | 5'-TCACTGCTATCGGGGNT   | CGATTAAAGCCATGCGAGTCAAGAG---GGGTC---AAGCC---CTCGGCA-3'   |
| <i>Methanospirillum hungatei</i> [AY196683]            | 5'-CCACTGCTATCGGGGTT   | TGACTAAGCCATGCGAGTCAAGAG---GTGC---AAGAC---CTCGGCG-3'     |
| <i>Methanocorpusculum parvum</i> [M59147]              | 5'-CCATTGCTATCAGGGTNT  | TGACTAAGCCATGCGAGTCAAGAG---GTGT---AAGAC---CTCGGCA-3'     |
| <i>Methanosaeta concilii</i> [X16932]                  | 5'-TTACTGCTATCGAGGTT   | CGACTAAGCCATGCGAGTCAATGTAGCAATACATGGCGAACTGCTCAGTA-3'    |
| Uncultured Firmicutes [AJ746422]                       | 5'-.....               | TGA TAAGCCATGCGAGTCAAGCGGGATTCTTTGATCAGCTTGCTGAGAGA-3'   |
| Uncultured Firmicutes [AY704384]                       | 5'-.....               | TGA TAAGCCATGCGAGTCAAGCGGGAGACTT---CGGTCT-----3'         |
| Uncultured Firmicutes [AY953162]                       | 5'-.....               | TGA TAAGCCATGCGAGTCAAGCGGAGGCATAGGGAAGAAGTTTTCGGATG-3'   |
| Uncultured Firmicutes [DQ088229]                       | 5'-.....               | TGATTA GCCATGCGAGTCAAGCGGAACA-----GTTTGGTTTCGATTG-3'     |

**Abb. 29: Vergleich der Bindungsstellen für die Primer 69F<sup>1</sup> und Arche2F<sup>2</sup> zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von methanogenen Archaea.**

<sup>1</sup> GIOVANNONI ET AL. 1990.

<sup>2</sup> DE LONG 1992, FERNANDEZ ET AL. 1999.

Der verwendete Rückwärts- (*reverse*) Primer ARC934R besteht aus 19 Nukleotiden und ist identisch mit dem von Giovannoni et al. 1990 publizierten Primer. Die Bindungsstelle entspricht Pos. 915 - 934 bp der *E. coli* 16S rDNA. Nach einem *in silico* Vergleich dieser Primer mit der 16S rDNA Sequenz von ausgewählten methanogenen Archaea-Arten publiziert in der NCBI GenBank wurde die komplementäre Bindungsstelle bei vielen methanogenen Archaea gefunden (Abb. 30).

|  |                                 |   |
|--|---------------------------------|---|
|  | ARC934R (Primersequenz)         | TGCTCCCCCGCAATTCCT                          |
|  | ARC934R (Bindungsstelle)        | AGGAATTGGCGGGGAGCA                          |
| <i>Methanococcus jannaschii</i> [M59126]               | 5'-GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACTACAACGGGTGGNACCGCGGT-3' |
| <i>Methanococcus maripaludis</i> [U38487]              | 5'-GGGAGTACGGTCGCAAGACTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGN-3' |
| <i>Methanothermus fervidus</i> [M59145]                | 5'-GGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |
| <i>Methanobacterium formicicum</i> [AF169245]          | 5'-GGAAGTACGGTCGCAAGACTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |
| <i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> [AY196660] | 5'-GGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |
| <i>Methanoculleus bourgense</i> [AY196674]             | 5'-GGNAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGC...-3' |
| <i>Methanofollis tationis</i> [AF095272]               | 5'-GGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |
| <i>Methanospirillum hungatei</i> [AY196683]            | 5'-GGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |
| <i>Methanosarcina mazei</i> [U20151]                   | 5'-GGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |
| <i>Methanosaeta concilii</i> [X16932]                  | 5'-GGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAA | AGGAATTGGCGGGGAGCACACAACGGGTGGAGCCTGCGGT-3' |

**Abb. 30: Vergleich der Bindungsstellen für den Primer ARC934R<sup>1</sup> zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von methanogenen Archaea.<sup>2</sup>**

Durch diese Maßnahmen konnte *in silico* eine wesentlich größere Übereinstimmung mit den 16S rDNA Sequenzen verschiedener Archaea wie z.B. *Methanoculleus* sp., *Methanospirillum* sp. oder *Methanococcus* sp. verglichen mit dem ursprünglichen Primer 69F erzielt werden.

*In vitro* konnten die *in silico* getroffenen Erwartungen bestätigt werden. Außer für die *Methanococcales* wurden Vertreter aller methanogener Ordnungen detektiert. Neben den bekannten Ordnungen wurden auffälligerweise eine Reihe taxonomisch noch nicht klassifizierter Archaea nachgewiesen. Hierzu zählen Vertreter der CA-11 Gruppe (GODON ET AL. 1997) und der ARC-I Gruppe (CHOUARI ET AL. 2005) (s. Abb. 29).

Es zeigte sich allerdings, dass neben der 16S rDNA von Archaea ebenfalls die 16S rDNA von verschiedenen Bacteria amplifiziert wurde. Hierbei handelt es sich in überwiegendem Maße um bisher taxonomisch näher eingeordnete Firmicutes. Wie der Vergleich der Bindungsstellen zeigt, wurden diese 16S rDNA Sequenzen aufgrund von Fehlpaarungen amplifiziert. Dieses kann eventuell durch eine ungenügende Oligonukle-

<sup>1</sup> GIOVANNONI ET AL. 1990.

<sup>2</sup> Die Analyse erfolgte auf Basis der 16S rDNA Sequenz von ausgewählten repräsentativen methanogenen Archaea-Arten publiziert in der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006).



otidsynthese oder durch zu wenig stringente PCR-Bedingungen verursacht sein. Letzteres könnte in weiteren Arbeiten optimiert werden.

#### 5.1.2.2 PCR-Primer zum Nachweis von Bacteria

Neben den methanbildenden Archaea sind für den Abbau von organischen Substanzen zu Biogas auch zahlreiche hydrolytische und fermentative Vertreter der Domäne Bacteria verantwortlich. Da Bacteria und Archaea phylogenetische weit getrennte Gruppen darstellen und sich in zahlreichen morphologischen und physiologischen Details insbesondere auf molekulare Ebene unterscheiden, ist die parallele Erfassung dieser beiden Organismengruppen in einem einzigen experimentellen Ansatz nicht in ausreichendem Umfang möglich.

Bei der Analyse eines CSTR-Biogasreaktors mit einer Monovergärung von Rübensilage wurde eine 16S rDNA Bibliothek für Archaea und Bacteria gemeinsam angelegt (KLOCKE ET AL. (2007)). In dieser Studie erwiesen sich von 60 nachgewiesenen OTU lediglich 4 als zugehörig zu der Domäne Archaea. Zwei der Archaea-OTU haben eine große Ähnlichkeit mit *Methanosarcina* sp., eine Archaea-OTU ließ sich mit *Methanosaeta* sp. in Verwandtschaft setzen und die vierte Archaea-OTU gehört zu einem Cluster mit unklassifizierten Archaea isoliert aus Umweltproben. Vertreter der Methanobacteriales oder der Methanomicrobiales wurden im Unterschied zu der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen in der Studie von KLOCKE ET AL. (2007) nicht detektiert. Dieses zeigt, dass für eine umfassende Analyse der archaellen Diversität die getrennte Betrachtung von Archaea und Bacteria eine grundlegende Voraussetzung ist. Experimentell lässt sich dieses nur mit der Konstruktion zweier 16S rDNA Banken umsetzen.

Die Erfassung der Diversität innerhalb der Bacteria erfolgte in dieser Arbeit also durch die Konstruktion von gesonderten 16S rDNA Bibliotheken. Hierzu wurde die Primer-Kombination 16S-Forw/16S-Rev verwendet, welche erstmals von LANE (1991) publiziert wurden und seitdem für eine Vielzahl von mikrobiologischen Diversitätsanalysen verwendet wurden. Das PCR-Produkt hat eine Größe von ca. 1500 bp (entsprechend Position von 8-28 bp und 1490-1512 bp in *E. coli*) und stellt somit eine nahezu vollständige Kopie der bakteriellen 16S rDNA Sequenz dar.

Die in dieser Arbeit ermittelten Daten zeigten, dass die Primer-Kombination 16S-Forw/16S-Rev ausschließlich bakterielle 16S rDNA Sequenzen der DNA-Proben aus den Biogasreaktoren detektiert hat. Hierbei wurde eine große Diversität von fakultativ

oder obligat anaeroben Mikroorganismen wie z.B. *Clostridia* sp., *Bacillus* sp., *Bacteroides* sp., und *Spirochaetes* sp. gefunden (Abb. 31) (Abb. 32). Es sind allerdings auch Arbeiten publiziert worden, in welchen gezeigt werden konnte, dass diese Primer-Kombination ebenfalls geeignet ist, archaelle 16S rDNA zu amplifizieren (REYSENBACH ET AL. 1992; REYSENBACH & PACE. 1994). Ein Grund für das Ausbleiben von archaeller 16S rDNA in den in dieser Arbeit mithilfe von 16S-Forw/16S-Rev konstruierten Banken könnte in dem Mengenverhältnis zwischen Bacteria und Archaea in dem Biogasreaktor liegen. Theoretisch sollten wesentlich mehr Bacteria, sowohl auf Ebene der Art wie auch der Individuen, als Archaea in den Biogasreaktoren enthalten sein.

|   | 16S-F                      | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG |
|---|----------------------------|----------------------|
| <i>Rhodopseudomonas palustris</i> [NC_007925]   | 5'-TTAAAGTTTCAAGTCCAACCTG  | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Clostridium acetobutylicum</i> [NC_003030]   | 5'-ATTATATCAAACCTTTTAAATTC | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [NC_008463]       | 5'-AAAACCCCAAGCAGTATTGAAC  | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Clostridium perfringens</i> [NC_008261]      | 5'-TATAGATTAACTTTTAAATTC   | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Bacillus anthracis</i> [NC_003997]           | 5'-CTAGACAACTAACTTTATTCG   | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> [NC_008054]    | 5'-AAAAGACTCAATTTTCAAATTC  | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Bartonella bacilliformis</i> [NC_008783]     | 5'-AATCAATTTTCATTCAACTTC   | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Acidovorax avenae</i> [NC_008752]            | 5'-TTAAATTTCAAGATCGAAGTGT  | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Desulfitobacterium hafniense</i> [NC_007907] | 5'-AAGTTCTTCATAAATTTTATGC  | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |
| <i>Staphylococcus saprophyticus</i> [NC_007350] | 5'-AAACATCATAATTTCATTTATG  | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG |

**Abb. 31: Vergleich der Bindungsstellen für den Primer 16S-F<sup>1</sup> zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von Bacteria.<sup>2</sup>**

|  | 16S-R (Primersequenz)        | TACGGYTACCTTGTTACGACTT  |
|--|------------------------------|-------------------------|
|  | 16S-R (Bindungsstelle)       | AAGTCGTAACAAGGTARCCGTA  |
| <i>Clostridium populi</i> [X71853]         | 5'-CGAAGGTGGAGCCNATGACTGGGGT | AAGTCGTAACAAGGTAAACCGTA |
| <i>Clostridium fervidus</i> [L09187]       | 5'-CGGCTGGATCACCTCCGATTGGGGT | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |
| <i>Spirochaeta alkalica</i> [X93927]       | 5'-CGAAGGTACGCCGTGGTAAGGGGGT | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |
| <i>Ehrlichia risticii</i> [M21290]         | 5'-CTACGGTGGGGTGGGTGACTGGGGT | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |
| <i>Cardiobacterium valvarum</i> [AF506987] | 5'-CCACGGTGTGGCCGATGACTGGGGT | AAGTCGTAACAAGGTAAACCGTA |
| <i>Desulfurella acetivorans</i> [X72768]   | 5'-NCATGGTAGGGTCAGCGACCGGGT  | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |
| <i>Megamonas hypermegale</i> [AJ420107]    | 5'-CGAAGGTGGGGCGATGATTGGGGT  | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |
| <i>Amphibacillus xylanus</i> [AJ496807]    | 5'-CGAAGGTGGGGCAATGATTGGGGT  | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |
| <i>Herpetosiphon</i> sp. [X86447]          | 5'-CGAGGGTGGGGCTCGTAACGGGAC  | AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA  |

**Abb. 32: Vergleich der Bindungsstellen für den Primer 16S-R<sup>3</sup> zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von Bacteria.<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> LANE 1991.

<sup>2</sup> Die Analyse erfolgte auf Basis der 16S rDNA Sequenz von ausgewählten repräsentativen Arten publiziert in der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006). Entsprechend des *single letter code* für Nukleotide steht M für A.

<sup>3</sup> LANE 1991.

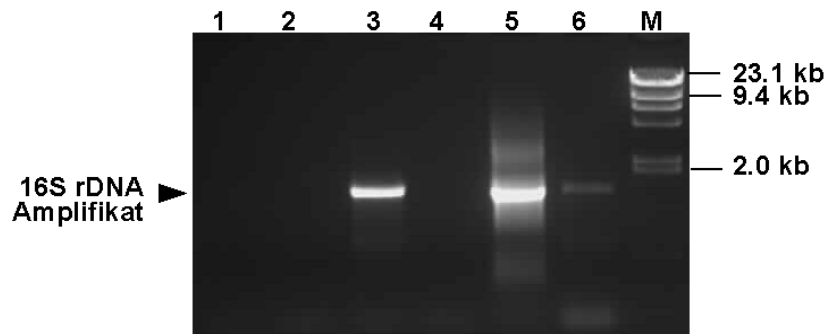
<sup>4</sup> Die Analyse erfolgte auf Basis der 16S rDNA Sequenz von ausgewählten repräsentativen Arten publiziert in der NCBI GenBank (BENSON ET AL. 2006). Entsprechend des *single letter code* für Nukleotide steht Y für T oder C und R für G oder A.

### 5.1.3 Einfluss des PCR-Regimes

Für eine Optimierung der PCR müssen insgesamt verschiedene Parameter wie Temperatur, Dauer der Schritte, Zyklenzahl, Reaktionschemie (z.B.  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration) entsprechend der gewählten Primer und des Templates angepasst werden.

In der Regel werden in einer PCR zwanzig bis vierzig Zyklen (Deanturierung, Annealing, Extension) durchlaufen, so dass man anschließend genug Material amplifiziert hat um es zu analysieren. Nachteilig ist hierbei jedoch, dass sich abhängig von dem PCR-Regime und der Art der verwendeten DNA-Polymerase Fehler in der Nukleotidsequenz als Folge eines Einbaus nicht-komplementärer Nukleotide akkumulieren können. Diese Fehler können bei der nachfolgenden phylogenetischen Auswertung der Nukleotidsequenzen eine größere genetische Distanz der zu analysierende Sequenz zu Referenzsequenzen und damit eine falsche taxonomische Einordnung verursachen. Aus diesem Grunde ist es sinnvoll, die Zahl der PCR-Zyklen und damit die Vermehrungsstufen der DNA auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

Um die optimale Zyklen-Zahl zu ermitteln wurde in dieser Arbeit zuerst eine Test-PCR mit 15 Zyklen, 25 Zyklen und 35 Zyklen durchgeführt (Abb. 33).



**Abb. 33: Der Einfluss der Zyklenzahl auf die Produktbildung bei der Amplifikation von bakterieller 16S rDNA.<sup>1</sup>**

In diesem Experiment zeigte sich, dass mit 25 Zyklen optimale Reaktionsbedingungen gegeben sind. Nach 15 Zyklen hat der Amplifikationsprozess noch zu keinem sichtbaren Produkt geführt. Die Erhöhung des PCR-Prozesses auf 35 Zyklen ergibt zwar mehr Produkt, neben dem erwarteten 1500 bp Amplifikat treten aber verstärkt längere und kürzere unspezifische Amplifikate auf (erkennbar an dem ‚Schmier‘ ober- und unterhalb

<sup>1</sup> (1) + (2) 15 PCR-Zyklen, (3) + (4) 25 PCR-Zyklen, (5) + (6) 35 PCR-Zyklen.

(1), (3), (5) mit DNA-Template isoliert aus einem Biogasreaktor, (2), (4), (6) ohne DNA-Template (= Negative Kontrolle). (M) Längenstandard.

des Hauptamplifikates). Wie an der Negativ-Kontrolle ohne Zugabe von Template-DNA erkennbar ist, steigt zu dem bei zunehmender Zyklenzahl die Gefahr der Produktbildung aus Kontaminationen mit einzelnen DNA-Molekülen in den Reaktionschemikalien.

Man könnte sich nun überlegen, einfach weitere Enzyme, weitere Primer, und weitere Nukleotide zuzugeben. Man hat festgestellt, dass mit zunehmender Zyklenzahl die Anzahl der falsch eingebauten Nukleotide und damit die Anzahl fehlerhafter Amplifikation ansteigt. Wegen dieser Erkenntnis werden in der Regel nicht mehr als 35 Zyklen durchgeführt. Als Beispiel: Für die Untersuchung der mikrobiellen Diversität in einem methanogenen Bioreaktor begrenzten FERNANDEZ ET AL. (1999) den PCR-Prozess auf eine Anzahl von 30 Zyklen. Gleiche Zyklenzahlen benutzten LALOUÏ-CARPENTIER ET AL. (2006) zur Analyse der Mikrobiologie in einem Bioreaktor zur Verwertung von Kommunalabfällen und WU ET AL. (2006) zur Beschreibung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften in einem anoxischem Boden.

## **5.2 Die mikrobiellen Lebensgemeinschaften in anaeroben Degradierungsprozessen**

Die mikrobielle Lebensgemeinschaft innerhalb eines Biogasreaktors ist in hohem Maße abhängig von der Art und Zusammensetzung des Substrates (Essigsäure, Ameisensäure, Methanol, Ethanol und Kohlendioxid) sowie des jeweiligen Milieus (pH-Wert, Temperatur). Es lassen sich jedoch grundsätzlich verschiedene Gruppen von Mikroorganismen mit ähnlichen Substratanforderungen definieren: (1) Fermentative Bacteria, welche die Oxidation der Kohlenhydrate zu VFA, Acetat und  $H_2$  durchführen; (2) Bacteria, welche die VFA in einer anaeroben Oxidation zu Acetat +  $H_2$  umwandeln; (3) Anaerobier, die Acetat zu  $H_2$  und  $CO_2$  oxidieren; (4) acetatverwertende methanbildende Archaea (acetotrophe Methanogene) sowie (5)  $H_2$ -oxidierende methanbildende Archaea (hydrogenotrophe Methanogene) (SCHMIDT & AHRING 1999, AHRING 2003) und (6) methylotrophe methanbildende Archaea (DEPPENMEIER ET AL 1996).

In den untersuchten Biogasreaktoren unterschiedlicher Bauweise konnten eine Reihe verschiedener fermentativer Bacteria und methanogener Archaea detektiert werden.

### **5.2.1 Die fermentativen Bacteria in Biogasreaktoren**

Bei der Hydrolyse werden aus polymeren Kohlenhydraten die überwiegend monomere Kohlenwasserstoffe wie Glucose, aus Proteinen überwiegend Peptide und Aminosäuren

und aus Fetten langkettige Fettsäuren sowie Glycerin produziert. In der zweiten Stufe, der Acetogenese, erfolgt die Umwandlung von Carbonsäuren, organischen Säuren und auch langkettigen Fettsäuren zu Acetat,  $H_2$ ,  $CO_2$  und  $H_2O$ .

Verantwortlich für diese Prozesse sind eine große Menge unterschiedlicher fermentativer Bacteria. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Teil dieser Bacteria identifiziert werden. Innerhalb der in dieser Arbeit untersuchten Biogasreaktoren wurde als eine sehr dominierende Gruppe typische fermentative Bacteria aus der Gattung *Clostridium* gefunden. In den untersuchten 16S rDNA Bibliotheken konnten diese Gruppe mit insgesamt 71 verschiedenen OTU entsprechend 32 % aller in dieser Arbeit detektierten OTU nachgewiesen werden. Diese 71 OTU wurden bei 145 Klonen der 16S rDNA Banken gefunden; dieses entspricht 30 % aller untersuchten 16S rDNA Klone.

*Clostridium* ist maßgeblich an dem fermentativen Abbau von Biomasse zu kurzkettigen organischen Verbindungen beteiligt. Aus Fermentationsprozessen isoliert wurde z.B. die obligat anaerobe Art *Clostridium jejuense* (JEONG ET AL, 2004). *C. jejuense* produziert Pyruvate, Lactate, Acetat, Formate und Wasserstoff als Endprodukte der Glucose-Fermentation. Teil der Prozesse zum Abbau von pflanzlicher Biomasse ist das Cellulose-abbauende *Clostridium straminisolvens* (SOUICHIRO ET AL. 2004). *C. straminisolvens* lebt in anaeroben thermophilen Milieus und benutzt Cellulose und Cellubiose als Energiequelle. Fermentationsprodukte sind Acetat, Lactat, Ethanol, Wasserstoff und Kohlendioxid.

*C. straminisolvens* benutzt keine Glucose oder Fructose als Energiequelle. *Syntrophospora bryantii* benutzt als Grundlage für seinen Stoffwechsel vorwiegend Butyrat und langkettige Aminosäure-Verbindungen (Peptide). *S. bryantii* wächst in einer syntrophen Verbindung mit hydrogenotrophen Anaerobiern, welche die Endprodukte von *S. bryantii*, Acetat, Propionat und  $H_2$ , wiederum für ihren eigenen Energie-Stoffwechsel nutzen (STIEB & SCHINK. 1985).

Neben den Clostridia wurden ebenfalls fermentative Bacteria aus anderen taxonomischen Einheiten gefunden. Beispielhaft genannt seien Vertreter der Gattung *Holdemania* aus der Klasse Mollicutes, (WILLEMS ET AL. 1997) und der Gattung *Arcobacter* aus dem Phylum Proteobacteria, (MONTGOMERY ET AL. 1988, BERA-MAILLET ET AL. 2004). Über die genauen Stoffwechselaktivitäten dieser Gattungen oder ihrer Funktion in Degradierungsprozessen ist jedoch nur wenig bekannt. Die reiche Diversität von säureproduzierenden Bacteria erfordert weitere molekulare Analysen um die Artenvielfalt

dieser für die Fermentation bedeutsamen Mikroorganismen zu untersuchen. Ebenso sind mikrobiologische und physiologische Analysen der von diesen durchgeführten Stoffwechselwege erforderlich.

Als weitere in den untersuchten 16S rDNA häufig vertretende Gruppe wurde OTU aus dem Phylum Bacteroides detektiert. Sie stellen 27 OTU (= 13 % aller detektierten OTU) und wurden bei 8 % aller untersuchten Klone (*i.e.* 35) gefunden.

Die molekulare Diversität und die Abundanz des Phylum Bacteroides in Biogasreaktoren hängt von der Komplexität der verfügbaren organischen Substrate ab. Innerhalb dieses Phylums finden sich häufig Arten wie z. B. *Cytophaga flavobacter* und *porphyromonas prevotella*, die fähig sind verschiedene Makromoleküle wie Cellulose, Pectin, Protein und andere anaerob zu degradieren (CHOUARI ET AL. 2005).

Das Phylum Spirochaetes wurde auch in Biogasreaktor detektiert. Dieses Phylum ist aber nur mit einer niedrigen Anzahl von OTU vertreten. Spirochaetes sind sehr aktiv in Degradierungsprozessen. Sie nutzen sowohl Kohlenhydrate als auch Aminosäuren für ihren Energiestoffwechsel (STANIER ET AL. 1987; FERNANDES ET AL. 1999).

### 5.2.2 Die methanbildenden Archaea in Biogasreaktoren

Für den letzten Schritt des anaeroben Abbaus von Biogas verantwortlich sind methanbildenden Archaea. Sie sind daher von entscheidender Bedeutung für den gesamten Prozess der Biogasbildung.

Die Methanbildung kann prinzipiell aus verschiedenen Substraten, nämlich aus H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub>, aber auch aus Ameisensäure, Essigsäure, Methanol oder Methylen erfolgen. Die Mehrzahl der bekannten Methanbildner können H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> umsetzen, während es nur wenige gibt, die Methanol oder Essigsäure verwerten können.

#### 5.2.2.1 Hydrogenotrophe Methanbildner

Nach dem Stand der Literatur wird etwa 70 % des Methans aus Essigsäure hergestellt. Damit ist die Essigsäurebildung ein wichtiger Faktor der Methanbildung. Die restlichen 30 % des gebildeten Methans werden aus Wasserstoff und Kohlendioxid gebildet (THIELE & ZEIKUS 1988; AHRING 2003). Diese Reaktion reduziert den Wasserstoffgehalt, welcher bei zu hoher Konzentration die bakterielle Essigsäurebildung hemmt (EDER & SCHULZ 2006).

Auffälligerweise konnte innerhalb aller vier Archaea-spezifischen 16S rDNA Banken die Mehrzahl der detektierten Archaea-Sequenzen in Verwandtschaft zu  $H_2$ -verwertenden Arten gebracht werden. Insgesamt 43 OTU entsprechend 26,6 % aller untersuchten OTU wurden für Archaea detektiert repräsentativ für 171 (27 %) der Archaea Klone. Die überwiegende Mehrzahl der OTU erwiesen sich als verwandt mit den hydrogenotrophen Gattungen *Methanoculleus* sp., *Methanocorpusculum* sp. und *Methanospirillum* sp. Weiterhin wurden OTU verwandt mit *Methanobacterium* sp. und *Methanobrevibacter* sp. gefunden.

Das häufige Auftreten von mit hydrogenotrophen Methanogenen verwandten OTU innerhalb der Archaea-spezifischen 16S rDNA Bibliothek sowie die höhere Diversität dieser OTU kann ein Indiz für eine größere  $H_2$ -konsumierende Archaea-Population innerhalb des Biogasreaktors sein verglichen mit der Population der acetotrophen Methanogenen. Durch eine große Population  $H_2$ -konsumierender Archaea würde die  $H_2$ -Konzentration auf einem niedrigen Niveau gehalten, was den Abbau der VFA zu Acetat durch syntrophe acetogene Bacteria forcieren würde (AHRING 2003).

Möglich ist auch die Anwesenheit einer syntrophen Gemeinschaft aus Fettsäuren oxidierenden Bacteria und den Wasserstoff verwertenden methanogenen Archaea in den untersuchten Biogasreaktoren. Hierbei werden die Fettsäuren durch die syntrophen Bakterien zu Acetat bzw.  $H_2/CO_2$  oxidiert. Anschließend kann der freigesetzte Wasserstoff direkt von hydrogenotrophen Archaea verstoffwechselt werden, welche dann als Endprodukt Methan freisetzen. Wasserstoff ist also ein wichtiges Zwischenprodukt in der Methanogenese-Reaktion (SEKIGUCHI ET AL. 2001).

Hydrogenotrophe Methanogene wurden bereits in früheren Arbeiten in unterschiedlichen anaeroben Bioreaktoren als dominierende Arten aus der Domäne Archaea beschrieben (SEKIGUCHI ET AL. 2001; TANG ET AL. 2004). So konnte die Ordnung der Methanobacteriales als eine vorherrschende Ordnung in mesophilen UASB Reaktoren bei der Fermentation von Gülle nachgewiesen werden (SEKIGUCHI ET AL. 1998, CHOUARI ET AL. 2005). Weitere Belege dafür wurden in einem anaeroben Belebtschlamm-Reaktor gepuffert mit Glucose (LECLERC ET AL. 2001) sowie in einem mesophilem CSTR-Klärschlamm-Reaktor (RASKIN ET AL. 1995) gefunden.

#### 5.2.2.2 Acetotrophe Methanbildner

Neben Wasserstoff ist Acetat ein weiteres sehr wichtiges Substrat für die Methanogenese in anaeroben Reaktor, welche organisches Material zu Biogas umwandeln (JERIS ET AL. 1965; SMITH ET AL. 1980).

In mehreren Arbeiten wurde nachgewiesen, dass in biogaserzeugenden Fermentationen ein Großteil des in dem Methan fixierten Kohlenstoffs aus Acetat stammt (THIELE & ZEIKUS 1988, AHRING 2003). In der Publikation von AHRING (2003) wurde ein optimierter Prozess der bakteriellen Acetogenese beschrieben. Potentielle Acetat-Verwerter unter den Archaea wurden in den untersuchten 16S rDNA Banken mit insgesamt 11 OTU detektiert. Dieses entspricht 15 % aller detektierten OTU archaellen Ursprungs. In den archaellen 16S rDNA Banken waren diese OTU bei 35 % aller untersuchten Klone (*i.e.* 154) vertreten.

Acetotrophe Methanbildner wurden bislang nur für die Arten *Methanosaeta concilii* (RASKIN ET AL. 1994) und *Methanosarcina barkeri* (SCHERER & SAHM 1981) beschrieben. Vertreter beider Arten waren in den untersuchten Biogasreaktoren vertreten. Die Gattung *Methanosaeta* scheint eine große Bedeutung in dem Abbau von Aminosäuren mit Acetat als Endprodukt zu besitzen (TANG ET AL. 2004). In den untersuchten Biogasreaktoren konnten vier OTU nachgewiesen werden, die in engerer Verwandtschaft zu der Art *Methanosaeta concilii* stehen. *Methanosaeta concilii* bzw. der Stamm FE wurde bereits zuvor in einem mesophilen UASB Reaktor (MUR) in granulösem Schlamm aus Abwasser gefunden (SEKIGUCHI ET AL. 1998).

Die Gattung *Methanosarcina* kann potentiell eine Vielzahl an Substraten wie Acetat, Methanol, Methylamine,  $H_2/CO_2$  und CO zur Methansynthese nutzen (SMITH ET AL. 1978; SMITH ET AL. 1980; BOONE & MAH 1987). Einzig bekannte acetat-verwertende Art ist *Methanosarcina barkeri* (SCHERER & SAHM. 1981). Diese Art wurde unter anderem in einem mesophilen Bioreaktor nach Beladung mit Abfällen aus der Weinproduktion gefunden (GODON ET AL 1997). Mit *M. barkeri* verwandte Stämme wurden in thermophilen Abwasserreaktoren nachgewiesen wie *M. str.* TM-1, *str.* CALS-1 und *str.* CHTI 55 (PETERSEN ET AL. 1991).

Die molekulare Diversität und die Abundanz von Vertretern der bakteriellen Phyla in den untersuchten anaeroben Reaktoren zeigen die starke Abhängigkeit und Verknüpfung zwischen der Art der organischen Substrate und den anaeroben Mikroorganismen,



welche die enthaltenen Makromoleküle wie Cellulose, Kohlenhydrate und Proteine degradieren.

#### 5.2.2.3 Unbekannte Archaea-Gruppen

Innerhalb der Euryarchaeota wurden neben den bestehenden distinkten Ordnungen der Methanobacteriales, Methanomicrobiales, Methanosarcinales und Methanococcales zwei neue Gruppen beschrieben, welche bislang nur als CA-11 Gruppe (GODON ET AL. 1997) und ARC-I (CHOUARI ET AL. 2005) beschrieben wurden. Die genaue taxonomische Einordnung dieser zwei Gruppen ist unbekannt.

Diese zwei Gruppen wurden als Teil der methanogenen Mikroflora bereits in verschiedenen Arbeiten beschrieben.

Der Cluster ARC-I wurde nachgewiesen in Gülle-Lagern (SNELL-CASTRO ET AL. 2005) und in einem anaeroben Abwasserschlamm verwertenden Reaktor (CHOUARI ET AL. 2005). Sie sind repräsentativ für eine Gruppe, die sehr häufig in methanogenen Umwelten detektiert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass diese Gruppe eine große Rolle bei der Substratdegradation in diesem Milieu spielt (CHOUARI ET AL. 2005).

Der zweite Cluster unklassifizierter Archaea wurde entsprechend des ersten Autors GODON ET AL. (1997) CA-11 genannt. Diese Gruppe zeigte wie die ARC-I Gruppe auch eine größere genetische Distanz bezogen auf die 16S rDNA zu den bekannten Archaea Ordnungen. Daher ist der Stoffwechsel dieser neuen Gruppe als völlig unbekannt einzustufen (SNELL-CASTRO ET AL. 2005).

#### 5.2.3 Unbekannte Mikroorganismen in den Biogasreaktoren

Über 300 Jahre nach der Beschreibung der ersten Bakterien und trotz unzähliger schon beschriebener Arten ist nach heutigem Kenntnisstand anzunehmen, dass die große Mehrheit von 95 bis 99 % aller auf unserem Planeten existierenden Bakterienarten noch nicht bekannt ist und beschrieben wurde.

Neben den Gruppen CA-11 und ARC-I wurden in den untersuchten 16S rDNA Banken eine Reihe OTU nachgewiesen, welche die höchsten Ähnlichkeiten innerhalb der 16S rDNA Nukleotidsequenz zu taxonomisch bisher nicht eindeutig zugeordneten Mikroorganismen haben. Diese Mikroorganismen wurden bislang nicht kultiviert, daher bleibt ihr Metabolismus unbekannt. Ausschließlich nachgewiesen wurden lediglich deren 16S rDNA in verschiedenen Umwelten im Rahmen von molekulargenetischen Studien ähn-

lich dieser. In der NCBI Genbank werden diese nicht näher spezifizierbaren Nukleotidsequenzen als *uncultured bacterium clone* bzw. *uncultured archaeon clone* geführt.

Innerhalb der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten 16S rDNA Bibliotheken wurden eine Reihe solcher „unklassifizierten Klone“ sowohl bakteriellen wie auch archaellen Ursprungs gefunden. Ähnliche Sequenzen wurden in einer Reihe verschiedener, überwiegend anaeroben Ökosysteme nachgewiesen, so z.B. in Lagern für Schweinegülle und -mist (Whitehead und Cotta 2004), in thermophilen Festmüll-Digestern (TANG ET AL. 2005), in einem Ölreservoir (GRABOWSKI ET AL. 2005), in salinen Milieus (DONG ET AL. 2006) und in den Böden von Reisfeldern (LALOUÏ-CARPENTIER ET AL. 2006). Manche dieser Mikroorganismen wurden auch in der Verdauungstraktflora von verschiedenen Organismen gefunden, so z.B. im Rumen von Rindern (WHITFORD ET AL. 1998) aber ebenso bei Insekten wie der Termiten *Cubitermes fungifaber* (DONOVAN ET AL. 2004) oder der Termiten *Cubitermes orthognathus* (FRIEDRICH ET AL. 2001). Letzte Organismen könnten von Bedeutung für den Abbau von Lignocellulose oder auch Lignin sein. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen DNA-Segmente sind grundsätzlich geeignet die Kultivierung dieser unbekannten Mikroorganismen zu erleichtern, da sie mit verhältnismäßig geringem experimentellen Aufwand in SONDENSYSTEME zur Identifizierung dieser Mikroorganismen umwandelbar sind.

#### 5.2.4 Änderung der Mikrobiologie während einer Übersäuerung des Reaktors

Die ungestörte Entwicklung der Mikroorganismen in einem Biogasreaktor ist sehr eng mit einem optimalen pH-Wert verbunden. Die anaerobe Biozönose ist als sehr pH-spezifisch einzustufen, hierbei wird der Toleranzbereich für den pH-Wert allgemein von pH 6,8 bis 7,5 angegeben (KAPP 1984). Dieser enge pH-Bereich wirft häufig bei dem Betrieb von Anaerobanlagen Probleme auf. So zeigten auch die Resultate dieser Untersuchung einen Zusammenhang zwischen der Zusammensetzung der Mikroorganismengemeinschaft und dem pH-Wert.

Die Mikroorganismen aus der Domäne Archaea zeigten eine große Diversität nachgewiesen durch eine hohe Anzahl an OTU in den Biogasreaktoren im normalen Betriebszustand mit einem optimalen pH-Wert von 6,8. Diese Befunde waren unabhängig von der Konstruktionsweise des Reaktors (CSTR oder *leach-bed*-Reaktor kombiniert mit Festbett-Anaerobfilter).

In dem untersuchten Reaktor im Zustand der Übersäuerung, also einem „unnormalen“ Zustand, bei welchem der pH-Wert mit einem Wert von 5,81 als sehr gering anzusehen ist, wurden Archaea nur mit einer geringen Diversität detektiert. In der entsprechenden Archaea-spezifischen 16S rDNA Bank wurden nur vier OTU (33 % aller OTU in der entsprechenden Archaea 16S rDNA Bank) repräsentativ für fünf Klone (33 % aller Klone in der entsprechenden Archaea 16S rDNA Bank) gefunden. Diese OTU gehörten alle zu der Ordnung Methanobacteriales, einer Ordnung mit ausschließlich hydrogenotrophen Methanbildnern. Keine OTU wurden für die anderen Archaea Ordnungen detektiert. Hiermit und nach der geringen Diversität der Archaea, die in dieser Bank nachgewiesen wurden, zu urteilen, konnte bestätigt werden, dass die optimalen Milieubedingungen der methanbildenden Lebensgemeinschaft insbesondere der Archaea im neutralen pH-Bereich liegt. Bei einer Übersäuerung des Reaktors können offensichtlich nur einzelne Methanbildner überleben; die breite Masse (bezogen auf die Artenvielfalt) der Archaea wird jedoch durch den erniedrigten pH-Wert abgetötet.

## 6 Schlussfolgerungen

Grundsätzlich bieten Biogasreaktoren eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der Ökologie mikrobieller Biozönosen. Obwohl Biogasanlagen seit vielen Jahren erfolgreich sowohl zur Reststoffbehandlung als auch, in jüngerer Zeit, zur Energieerzeugung eingesetzt werden, sind die mikrobiellen Stoffwandlungsprozesse in diesem System nicht vollständig verstanden. Mit dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die molekulargenetische Analyse ein geeignetes Werkzeug zur Untersuchung mikrobieller Gemeinschaften in Biogas-Reaktoren trotz der Komplexität des Substrates und der beteiligten mikrobiellen Gemeinschaft darstellt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben klare Hinweise darauf, dass in Biogasreaktoren eine Biozönose mit einer großen Diversität und vielschichtigen Interaktionen vorliegt. Es konnten eine Vielzahl verschiedener anaerober fermentativ-aktiver Bacteria und methanogener Archaea nachgewiesen werden. Weiterführende experimentelle Ansätze sollten vor allem zur Aufklärung der Aktivität dieser Populationen in Biogasreaktoren führen.

Untersuchungen der Biozönosen in anaeroben technischen Systemen werden bisher nur selten durchgeführt. Hierbei wurden die mikrobiellen Untersuchungen mit wenigen Ausnahmen überwiegend auf molekularer Ebene durchgeführt. Auf eine Kultivierung der Organismen wurde in den meisten Fällen verzichtet. Durch diesen Mangel werden physiologische Untersuchungen an den Reinkulturen unmöglich, welche einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des Gesamtsystems leisten könnten. Basierend auf den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen kann in weiteren Arbeiten die gezielte Anreicherung und Kultivierung von einzelnen dominanten Mikroorganismenspezies erfolgen.

Weiterhin sollte die Übertragbarkeit der Ergebnisse durch detaillierte Untersuchungen an anderen Biogasreaktoren geklärt werden. Hierbei sollte der in dieser Untersuchung eingesetzte molekulargenetische Ansatz durch klassische mikrobiologische Methoden ergänzt werden, damit ein möglichst vollständiger Überblick der mikrobiellen Biozönose gewonnen werden kann.

Ein besonderer Schwerpunkt weiterführender Arbeiten sollte auf der Quantifizierung hydrogenotropher und acetotropher Methanbildner liegen, um die Stoffflüsse innerhalb der Methanogenese charakterisieren und idealerweise auch modellieren zu können. Für eine solche gruppenspezifische Quantifizierung könnte die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) genutzt werden. Die hierfür erforderlichen DNA-Sonden können in kurzer Zeit mithilfe des in dieser Studie erarbeiteten Materials entwickelt werden.

---

Erst die vollständige Aufklärung der Lebensgemeinschaften insbesondere der Rolle einzelner Mikroorganismengruppen in der Interaktion mit der restlichen Mikroflora wird die Beschreibung der komplexen Vorgänge innerhalb eines Biogasreaktors ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- Ahring, B. K. (2003): Perspectives for anaerobic digestion, *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, (Band 82), Seite 1-29.
- Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W. und Lipman, D. J. (1990): Basic Local Alignment Search Tool, *Journal of Molecular Biology* (Band 215), Nr. 3, Seite 403-410.
- Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J. H.; Zhang, Z.; Miller, W. und Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Research* (Band 25), Nr. 17, Seite 3389-3402.
- Amann, R. I.; Stromley, J.; Devereux, R.; Key, R. und Stahl, D. A. (1992): Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 58), Nr. 2, Seite 614-623.
- Amann, R. I.; Ludwig, W. und Schleifer, K. H. (1995): Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial-cells without cultivation, *Microbiological Reviews* (Band 59), Nr. 1, Seite 143-169.
- Amon, T. H. (2003): Optimierung der Biogaserzeugung aus den Energiepflanzen Mais und Klee gras. Institut für Land-, Umwelt- und Energietechnik, Universität für Bodenkultur Wien.
- Anonymus (2004): Erneuerbare-Energien-Gesetz vom 21. Juli 2004 (BGBl. I S. 1918), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 7. November 2006 (BGBl. I. S. 2550), [http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ee\\_g\\_2004/gesamt.pdf](http://www.gesetze-im-internet.de/bundesrecht/ee_g_2004/gesamt.pdf), zuletzt aufgerufen am 22.06.2007.
- Barns, S. M.; Delwiche, C. F.; Palmer, J. D. und Pace, N. R. (1996): Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 93), Nr. 17, Seite 9188-9193.
- Bartlett, J. G. (2007): *Clostridium difficile* - old and new observations, *Journal of Clinical Gastroenterology* (Band 41), Nr. 5, Seite S24-S29.
- Benson, D. A.; Karsch-Mizrachi, I.; Lipman, D. J.; Ostell, J. und Wheeler, D. L. (2006): GenBank, *Nucleic Acids Research* (Band 34), Seite D16-D20.
- Bera-Maillet, C.; Ribot, Y. und Forano, E. (2004): Fiber-degrading systems of different strains of the genus *Fibrobacter*, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 70), Nr. 4, Seite 2172-2179.
- Blattner, F. R.; Plunkett, G.; Bloch, C. A.; Perna, N. T.; Burland, V.; Riley, M.; ColladoVides, J.; Glasner, J. D.; Rode, C. K.; Mayhew, G. F.; Gregor, J.; Davis, N. W.; Kirkpatrick, H. A.; Goeden, M. A.; Rose, D. J.; Mau, B. und Shao, Y. (1997): The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science* (Band 277), Nr. 5331, Seite 1453-1462.

- Bleuminkpluym, N. M. C.; Houwers, D. J. und Peetersvangent, S. D. (1994): Sample preparation for M-paratuberculosis polymerase chain-reaction in feces and tissues, *Veterinary Record* (Band 135), Nr. 5, Seite 120-120.
- Boone, D. R. und Mah, R. A. (1987): Effects of calcium, magnesium, ph, and extent of growth on the morphology of *Methanosarcina mazei* S-6, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 53), Nr. 7, Seite 1699-1700.
- Bose, M.; Chander, A. und Das, R. H. (1993): A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria, *Nucleic Acids Research* (Band 21), Nr. 10, Seite 2529-2530.
- Breter, H. J.; Kurelec, B.; Muller, W. E. G. und Zahn, R. K. (1977): Thymine content of sea-water as a measure of biosynthetic potential, *Marine Biology* (Band 40), Nr. 1, Seite 1-8.
- Challans, J. A.; Stevenson, K.; Reid, H. W. und Sharp, J. M. (1994): A rapid method for the extraction and detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from clinical specimens, *Veterinary Record* (Band 134), Nr. 4, Seite 95-96.
- Chenna, R.; Sugawara, H.; Koike, T.; Lopez, R.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. und Thompson, J. D. (2003): Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs, *Nucleic Acids Research* (Band 31), Nr. 13, Seite 3497-3500.
- Chouari, R.; Le Paslier, D.; Daegelen, P.; Ginestet, P.; Weissenbach, J. und Sghir, A. (2005): Novel predominant archaeal and bacterial groups revealed by molecular analysis of an anaerobic sludge digester, *Environmental Microbiology* (Band 7), Nr. 8, Seite 1104-1115.
- Collins, D. M.; Hilbink, F.; West, D. M.; Hosie, B. D.; Cooke, M. M. und Delisle, G. W. (1993): Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by fecal culture, DNA characterization and the polymerase chain-reaction, *Veterinary Record* (Band 133), Nr. 24, Seite 599-600.
- DasSarma, S.; Fleischmann, E. M. und Rodriguez Valera, F. (1995): *Archaea: a laboratory manual – halophiles*, 1. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, New York.
- Delbes, C.; Moletta, R. und Godon, J. J. (2001): Bacterial and archaeal 16S rDNA and 16S rRNA dynamics during an acetate crisis in an anaerobic digester ecosystem, *FEMS Microbiology Ecology* (Band 35), Nr. 1, Seite 19-26.
- De Long, E. F. (1992): Archaea in coastal marine environments, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 89 ), Nr. 12, Seite 5685- 5689.
- De Long, E. F. und Karl, D. M. (2005): Genomic perspectives in microbial oceanography, *Nature* (Band 437), Nr. 7057, Seite 336-342.
- Deppenmeier, U.; Muller, V. und Gottschalk, G. (1996): Pathways of energy conservation in methanogenic archaea, *Archives of Microbiology* (Band 165), Nr. 3, Seite 149-163.

- Dong, H. L.; Zhang, G. X.; Jiang, H. C.; Yu, B. S.; Chapman, L. R.; Lucas, C. R. und Fields, M. W. (2006): Microbial diversity in sediments of saline Qinghai Lake, China: Linking geochemical controls to microbial ecology, *Microbial Ecology* (Band 51), Nr. 1, Seite 65-82.
- Donovan, S. E.; Purdy, K. J.; Kane, M. D. und Eggleton, P. (2004): Comparison of *Euryarchaea* strains in the guts and food-soil of the soil-feeding termite *Cubitermes fungifaber* across different soil types, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 70), Nr. 7, Seite 3884-3892.
- Dubourguier, H. C.; Archer, D. B.; Albagnac, G. und Prensier, G. (1988): Structure and metabolism of methanogenic microbial conglomerates, Hall E. R., Hobson P. N., *Anaerobic digestion*, Seite 13-25, Pergamon Press, Oxford.
- Dupuy, B.; Mani, N.; Katayama, S. und Sonenshein, A. L. (2005): Transcription activation of a UV-inducible *Clostridium perfringens* bacteriocin gene by a novel sigma factor, *Molecular Microbiology* (Band 55), Nr. 4, Seite 1196-1206.
- Eder, B. und Schulz, H. (2006): *Biogas Praxis*, 3. Auflage, Ökobuch Verlag, Staufen bei Freiburg.
- Fachverband Biogas e.V. (2007): *Biogas 2006*, Zubau erstmals gleich auf mit Windkraft. Leipzig, Pressemitteilung vom 01.02.2007. [www.biogas.org](http://www.biogas.org)
- Fang, H.; Zhang, T. und Liu, H. (2002): Microbial diversity of a mesophilic hydrogen-producing sludge, *Applied Microbiology and Biotechnology* (Band 58), Seite 112-118.
- Fang, H. H. P. und Kwong, T. S. (1995): Anaerobic-digestion of starch particulates in an upflow sludge blanket filter reactor, *Environmental Technology* (Band 16), Nr. 1, Seite 13-23.
- Farrow, J. A. E.; Lawson, P. A.; Hippe, H.; Gauglitz, U. und Collins, M. D. (1995): Phylogenetic evidence that the gram-negative nonsporulating bacterium *Tissierella* (Bacteroides) *praeacuta* is a member of the *Clostridium* subphylum of the gram-positive Bacteria and description of *Tissierella creatinini* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* (Band 45), Nr. 3, Seite 436-440.
- Felsenstein, J. (1985): Confidence-limits on phylogenies - an approach using the bootstrap, *Evolution* (Band 39), Nr. 4, Seite 783-791.
- Fernandez, A.; Huang, S. Y.; Seston, S.; Xing, J.; Hickey, R.; Criddle, C. und Tiedje, J. (1999): How stable is stable? Function versus community composition, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 65), Nr. 8, Seite 3697-3704.
- Fiers, W.; Contreras, R.; Duerinck, F.; Haegeman, G.; Iserentant, D.; Merregaert, J.; Minjou, W.; Molemans, F.; Raeymaekers, A.; Vandenberghe, A.; Volckaert, G. und Ysebaert, M. (1976): Complete nucleotide-sequence of bacteriophage MS2-RNA - primary and secondary structure of replicase gene, *Nature* (Band 260), Nr. 5551, Seite 500-507.



- Friedrich, M. W.; Schmitt-Wagner, D.; Lueders, T. und Brune, A. (2001): Axial differences in community structure of *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* in the highly compartmentalized gut of the soil-feeding termite *Cubitermes orthognathus*, Applied and Environmental Microbiology (Band 67), Nr. 10, Seite 4880-4890.
- Garrity, G. M.; Writers, M. und Seales, D. B. (2001): Taxonomic outline of the pro-caryotic genera, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2. Auflage.
- Giovannoni, S. J.; Britschgi, T. B.; Moyer, C. L. und Field, K. G. (1990): Genetic diversity in sargasso sea bacterioplankton, Nature (Band 345), Nr. 6270, Seite 60-63.
- Glöckner, F. O.; Kube, M.; Bauer, M.; Teeling, H.; Lombardot, T.; Ludwig, W.; Gade, D.; Beck, A.; Borzym, K.; Heitmann, K.; Rabus, R.; Schlesner, H.; Amann, R. und Reinhardt, R. (2003): Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (Band 100), Nr. 14, Seite 8298-8303.
- Godon, J. J.; Zumstein, E.; Dabert, P.; Habouzit, F. und Moletta, R. (1997): Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis, Applied and Environmental Microbiology (Band 63), Nr. 7, Seite 2802-2813.
- Goodyear, P.D.; MacLoughlinblack, S. & Mason, I. (1994): A reliable method for the removal of copurifying PCR inhibitors from ancient DNA, Biotechniques, Band 16, Seite 840.
- Grabowski, A.; Nercessian, O.; Fayolle, F.; Blanchet, D. und Jeanthon, C. (2005): Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir, Fems Microbiology Ecology (Band 54), Nr. 3, Seite 427-443.
- Graves, L. M.; Swaminathan, B.; Reeves, M. W. und Wenger, J. (1991): Ribosomal DNA fingerprinting of listeria-monocytogenes using a digoxigenin-labeled DNA probe, European Journal of Epidemiology (Band 7), Nr. 1, Seite 77-82.
- Grimont, F. und Grimont, P. A. D. (1986): Ribosomal ribonucleic-acid gene restriction patterns as potential taxonomic tools, Annales de l'Institut Pasteur-Microbiologie (Band 137B), Nr. 2, Seite 165-175.
- Harmsen, D. und Karch, H. (2004): 16S rDNA for diagnosing pathogens: a living tree, ASM News (Band 70), Nr. 1, Seite 19-24.
- Hedrick, D. B.; Peacock, A.; Stephen, J. R.; Macnaughton, S. J.; Bruggemann, J. und White, D. C. (2000): Measuring soil microbial community diversity using polar lipid fatty acid and denaturing gradient gel electrophoresis data, Journal of Microbiological Methods (Band 41), Nr. 3, Seite 235-248.
- Hill, E. B.; Wayne, L. G. und Gross, W. M. (1972): Purification of mycobacterial deoxyribonucleic acid, Journal of Bacteriology (Band 112), Nr. 3, Seite 1033-1039.
- Hofman-Bang, J.; Zheng, D.; Westermann, P.; Ahring, B. K. und Raskin, L. (1988): Molecular ecology of anaerobic reactor systems, Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology (Band 81), Seite 151-203.

- Hohn, M. J.; Hedlund, B. P. und Huber, H. (2002): Detection of 16S rDNA sequences representing the novel phylum "Nanoarchaeota": Indication for a wide distribution in high temperature biotopes, *Systematic and Applied Microbiology* (Band 25), Nr. 4, Seite 551-554.
- Holben, W. E.; Jansson, J. K.; Chelm, B. K. und Tiedje, J. M. (1988): DNA probe method for the detection of specific microorganisms in the soil bacterial community, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 54), Nr. 3, Seite 703-711.
- Honore-Bouakline, S.; Vincensini, J. P.; Giacuzzo, V.; Lagrange, P. H. und Herrmann, J. L. (2003): Rapid diagnosis of extrapulmonary tuberculosis by PCR: Impact of sample preparation and DNA extraction, *Journal of Clinical Microbiology* (Band 41), Nr. 6, Seite 2323-2329.
- Hurley, S. S.; Splitter, G. A. und Welch, R. A. (1987): Rapid lysis technique for mycobacterial species, *Journal of Clinical Microbiology* (Band 25), Nr. 11, Seite 2227-2229.
- Jeong, H.; Yi, H.; Sekiguchi, Y.; Muramatsu, M.; Kamagata, Y. und Chun, J. (2004): *Clostridium jejuense* sp. nov., isolated from soil, *Systematic and Evolutionary Microbiology* (Band 54), Seite 1465-1468.
- Jeris, J. S. und McCarty, P. L. (1965): The biochemistry of methane fermentation using C14 tracers, *Journal - Water Pollution Control Federation* (Band 37), Seite 178-192.
- John, H. A.; Birnstiel, M. L. und Jones, K. W. (1969): RNA-DNA hybrids at cytological level, *Nature* (Band 223), Nr. 5206, Seite 582-587.
- Jones, A. S. und Walker, R. T. (1963): Isolation and analysis of deoxyribonucleic acid of *Mycoplasma mycoides* var. *Capri*, *Nature* (Band 198), Nr. 488, Seite 588-589.
- Kambouris, S.J.; Chaudhary, A. K. & Blair, I. A. (1996): Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectroscopy (LC/ESI MS/MS) analysis of 1,2-epoxybutene adducts of purine deoxynucleosides, *Toxicology*, 113, Seite 331-335.
- Kandler, O. und König, H. (1998): Cell wall polymers in Archaea (Archaeobacteria), *Cellular and Molecular Life Sciences* (Band 54), Nr. 4, Seite 305-308.
- Kapp, H. (1984): Sludge thickening prior to anaerobic-digestion, *Water Science and Technology* (Band 16), Nr. 12, Seite 419-432.
- Karl, D. M. und Bailiff, M. D. (1989): The measurement and distribution of dissolved nucleic-acids in aquatic environments, *Limnology and Oceanography* (Band 34), Nr. 3, Seite 543-558.
- Kato, S.; Haruta, S.; Cui, Z. J.; Ishii, M.; Yokota, A. und Igarashi, Y. (2004): *Clostridium straminisolvens* sp. nov., a moderately thermophilic, aerotolerant and cellulolytic bacterium isolated from a cellulose-degrading bacterial community, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Band 54), Seite 2043-2047.

- Klocke, M.; Mähnert, P.; Mundt, K.; Souidi, K. und Linke, B. (2007): Microbial community analysis of a biogas-producing completely stirred tank reactor fed continuously with fodder beet silage as mono-substrate, *Systematic and Applied Microbiology* (Band 30), Nr. 2, Seite 139-151.
- Klocke, M.; Mumme, J.; Souidi, K.; Mundt, K.; Nettmann, E.; Bergmann, I. und Linke, B. (2007): High diversity of methanogenic Archaea in a triticale-silage utilizing two-phase anaerobic leach-bed system with anaerobic filter, eingereicht zur Publikation.
- Kumar, S.; Tamura, K. und Nei, M. (2003): MEGA3: an integrated software for molecular evolutionary genetic analysis and sequence alignment, *Integrative and Comparative Biology* (Band 43), Nr. 6, Seite 947-947.
- Kuntz, R. L.; Hartel, P. G.; Godfrey, D. G.; McDonald, J. L.; Gates, K. W. und Segars, W. I. (2003): Targeted sampling protocol as prelude to bacterial source tracking with *Enterococcus faecalis*, *Journal of Environmental Quality* (Band 32), Nr. 6, Seite 2311-2318.
- Laloui-Carpentier, W.; Li, T.; Vigneron, V.; Mazeas, L. und Bouchez, T. (2006): Methanogenic diversity and activity in municipal solid waste landfill leachates, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* (Band 89), Nr. 3-4, Seite 423-434.
- Lane, D. J. (1991): 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E. und Goodfellow, M. (Hrsg.): *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, Wiley-VCH, Chichester, Seite 115-175.
- Leclerc, M.; Delbes, C.; Moletta, R. und Godon, J. J. (2001): Single strand conformation polymorphism monitoring of 16S rDNA Archaea during start-up of an anaerobic digester, *FEMS Microbiology Ecology* (Band 34), Nr. 3, Seite 213-220.
- Lemee, L.; Dhalluin, A.; Pestel-Caron, M.; Lemeland, J. F. und Pons, J. L. (2004): Multilocus sequence typing analysis of human and animal *Clostridium difficile* isolates of various toxigenic types, *Journal of Clinical Microbiology* (Band 42), Nr. 6, Seite 2609-2617.
- Lettinga, G. (1996): Sustainable integrated biological wastewater treatment, *Water Science and Technology* (Band 33), Nr. 3, Seite 85-98.
- Linke, B. und Mähnert, P. (2005): Biogasgewinnung aus Rindergülle und nachwachsenden Rohstoffen - Einfluss der Belastung des Fermenters, *Agrartechnische Forschung* (Band 11), Seite 125-132.
- Lueders, T.; Chin, K. J.; Conrad, R. und Friedrich, M. (2001): Molecular analyses of methyl-coenzyme M reductase alpha-subunit (*mcrA*) genes in rice field soil and enrichment cultures reveal the methanogenic phenotype of a novel archaeal lineage, *Environmental Microbiology* (Band 3), Nr. 3, Seite 194-204.
- Luton, P. E.; Wayne, J. M.; Sharp, R. J. und Riley, P. W. (2002): The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill, *Microbiology-SGM* (Band 148), Seite 3521-3530.

- Macleod, F. A.; Guiot, S. R. und Costerton, J. W. (1990): Layered structure of bacterial aggregates produced in an upflow anaerobic sludge bed and filter reactor, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 56), Nr. 6, Seite 1598-1607.
- Madigan, M. T. und Martinko, J. M. (2006): *Brock Mikrobiologie*, 11. Auflage, Seite 1203 pp, Pearson Education, München, Deutschland.
- Margulies, M.; Egholm, M.; Altman, W. E.; Attiya, S.; Bader, J. S.; Bemben, L. A.; Berka, J.; Braverman, M. S.; Chen, Y. J.; Chen, Z. T.; Dewell, S. B.; Du, L.; Fierro, J. M.; Gomes, X. V.; Godwin, B. C.; He, W.; Helgesen, S.; Ho, C. H.; Irzyk, G. P.; Jando, S. C.; Alenquer, M. L. I.; Jarvie, T. P.; Jirage, K. B.; Kim, J. B.; Knight, J. R.; Lanza, J. R.; Leamon, J. H.; Lefkowitz, S. M.; Lei, M.; Li, J.; Lohman, K. L.; Lu, H.; Makhijani, V. B.; Mcdade, K. E.; McKenna, M. P.; Myers, E. W.; Nickerson, E.; Nobile, J. R.; Plant, R.; Puc, B. P.; Ronan, M. T.; Roth, G. T.; Sarkis, G. J.; Simons, J. F.; Simpson, J. W.; Srinivasan, M.; Tartaro, K. R.; Tomas, A.; Vogt, K. A.; Volkmer, G. A.; Wang, S. H.; Wang, Y.; Weiner, M. P.; Yu, P. G.; Begley, R. F. und Rothberg, J. M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors, *Nature* (Band 437), Nr. 7057, Seite 376-380.
- Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1977): New method for sequencing DNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 74), Nr. 2, Seite 560-564.
- Montgomery, L.; Flesher, B. und Stahl, D. (1988): Transfer of *Bacteroides succinogenes* (Hungate) to *Fibrobacter* gen. nov. as *Fibrobacter succinogenes* comb. nov. and description of *Fibrobacter intestinalis* sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* (Band 38), Nr. 4, Seite 430-435.
- Moreira, F. M. S.; Haukka, K. und Young, J. P. W. (1998): Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil, *Molecular Ecology* (Band 7), Nr. 7, Seite 889-895.
- Moss, P.; Charmley, P.; Mulvihill, E.; Ziegler, S.; Raugi, G. J.; Kern, D.; Piepkorn, M. und Gelinas, R. (1997): The repertoire of T cell antigen receptor beta-chain variable regions associated with psoriasis vulgaris, *Journal of Investigative Dermatology* (Band 109), Nr. 1, Seite 14-19.
- Olsen, G. J.; Overbeek, R.; Larsen, N.; Marsh, T. L.; Mccaughey, M. J.; Maciukenas, M. A.; Kuan, W. M.; Macke, T. J.; Xing, Y. Q. und Woese, C. R. (1992): The Ribosomal Database Project, *Nucleic Acids Research* (Band 20), Seite 2199-2200.
- Olsen, G. J. und Woese, C. R. (1997): Archaeal genomics: an overview, *Cell* (Band 89), Nr. 7, Seite 991-994.
- Pardue, M. L. und Gall, J. G. (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to DNA of cytological preparations, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 64), Nr. 2, Seite 600-604.
- Petersen, S. P. und Ahring, B. K. (1991): Acetate oxidation in a thermophilic anaerobic sewage-sludge digester - the importance of non-aceticlastic methanogenesis from acetate, *FEMS Microbiology Ecology* (Band 86), Nr. 2, Seite 149-157.

- Picard, C.; Ponsonnet, C.; Paget, E.; Nesme, X. und Simonet, P. (1992): Detection and enumeration of Bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain-reaction, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 58), Nr. 9, Seite 2717-2722.
- Plöchl, M. und Heiermann, M. (2002): Ökologische Bewertung der Bereitstellung landwirtschaftlicher Kosubstrate zur Biogaserzeugung, *Bornimer Agrartechnische Berichte* (Band 32), Seite 98-106.
- Popovic, T.; Bopp, C.; Olsvik, O. und Wachsmuth, K. (1993): Epidemiologic application of a standardized ribotype scheme for *Vibrio cholerae* 01, *Journal of Clinical Microbiology* (Band 31), Nr. 9, Seite 2474-2482.
- Ralph, R. K. und Bellamy, A. R. (1964): Isolation and purification of undegraded ribonucleic acids, *Biochimica et Biophysica Acta* (Band 87), Nr. 1, Seite 9-16.
- Raskin, L.; Zheng, D. D.; Griffin, M. E.; Stroot, P. G. und Misra, P. (1995): Characterization of microbial communities in anaerobic bioreactors using molecular probes, *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* (Band 68), Nr. 4, Seite 297-308.
- Raskin, L.; Rittmann, B. E. und Stahl, D. A. (1996): Competition and coexistence of sulfate-reducing and methanogenic populations in anaerobic biofilms, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 62), Nr. 10, Seite 3847-3857.
- Reysenbach, A. L.; Giver, L. J.; Wickham, G. S. und Pace, N. R. (1992): Differential amplification of ribosomal-RNA genes by polymerase chain-reaction, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 58), Nr. 10, Seite 3417-3418.
- Reysenbach, A. L.; Wickham, G. S. und Pace, N. R. (1994): Phylogenetic analysis of the hyperthermophilic pink filament community in Octopus Spring, Yellowstone-National-Park, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 60), Nr. 6, Seite 2113-2119.
- Rheims, H. und Stackebrandt, E. (1999): Application of nested polymerase chain reaction for the detection of as yet uncultured organisms of the class Actinobacteria in environmental samples, *Environmental Microbiology* (Band 1), Nr. 2, Seite 137-143.
- Rohdich, F.; Wiese, A.; Feicht, R.; Simon, H. und Bacher, A. (2001): Enoate reductases of *Clostridia* - cloning, sequencing, and expression, *Journal of Biological Chemistry* (Band 276), Nr. 8, Seite 5779-5787.
- Saitou, N. und Nei, M. (1987): The Neighbor-Joining Method - A new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution* (Band 4), Nr. 4, Seite 406-425.
- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2001): *Molecular cloning - a laboratory manual*, 3. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sanger, F. und Coulson, A. R. (1975): Rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA-polymerase, *Journal of Molecular Biology* (Band 94), Nr. 3, Seite 441-448.

- Sanger, F.; Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 74), Nr. 12, Seite 5463-5467.
- Scherer, P. und Sahm, H. (1981): Influence of sulfur-containing-compounds on the growth of *Methanosarcina barkeri* in a defined medium, *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* (Band 12), Nr. 1, Seite 28-35.
- Schlesner, H.; Rensmann, C.; Tindall, B. J.; Gade, D.; Rabus, R.; Pfeiffer, S. und Hirsch, P. (2004): Taxonomic heterogeneity within the Planctomycetales as derived by DNA-DNA hybridization, description of *Rhodopirellula baltica* gen. nov., sp. nov., transfer of *Pirellula marina* to the genus *Blastopirellula* gen. nov. as *Blastopirellula marina* comb. nov. and emended description of the genus *Pirellula*, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Band 54), Seite 1567-1580.
- Schmidt, J. E. und Ahring, B. K. (1999): Immobilization patterns and dynamics of acetate-utilizing methanogens immobilized in sterile granular sludge in upflow anaerobic sludge blanket reactors, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 65), Nr. 3, Seite 1050-1054.
- Seghezzo, L.; Zeeman, G.; van Lier, J. B.; Hamelers, H. V. M. und Lettinga, G. (1998): A review: The anaerobic treatment of sewage in UASB and EGSB reactors, *Bioresource Technology* (Band 65), Nr. 3, Seite 175-190.
- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y.; Syutsubo, K.; Ohashi, A.; Harada, H. und Nakamura, K. (1998): Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology-SGM* (Band 144), Seite 2655- 2665.
- Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y. und Harada, H. (2001): Recent advances in methane fermentation technology, *Current Opinion in Biotechnology* (Band 12), Seite 277-282.
- Smith, M. R. und Mah, R. A. (1978): Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 36), Nr. 6, Seite 870-879.
- Smith, M. R. und Mah, R. A. (1980): Acetate as sole carbon and energy-source for growth of *Methanosarcina* strain 227, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 39), Nr. 5, Seite 993-999.
- Snell-Castro, R.; Godon, J. J.; Delgenes, J. P. und Dabert, P. (2005): Characterisation of the microbial diversity in a pig manure storage pit using small subunit rDNA sequence analysis, *FEMS Microbiology Ecology* (Band 52), Nr. 2, Seite 229-242.
- Southern, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel-electrophoresis, *Journal of Molecular Biology*, (Band 98), Seite 503-517.
- Stanier, R. Y.; Ingraham, J. L.; Wheelis, M. L. und Painter, P. R. (1987): *General Microbiology*, 5. Auflage, Macmillan Press, Großbritannien.

- Stieb, M. und Schink, B. (1985): Anaerobic oxidation of fatty-acids by *Clostridium bryantii* sp. nov., a sporeforming, obligately syntrophic bacterium, Archives of Microbiology (Band 140), Nr. 4, Seite 387-390.
- Studier, J. A. und Keppler, K. J. (1988): A note on the Neighbor-Joining Algorithm of Saitou and Nei, Molecular Biology and Evolution (Band 5), Nr. 6, Seite 729-731.
- Stull, T. L.; Lipuma, J. J. und Edlind, T. D. (1988): A broad-spectrum probe for molecular epidemiology of bacteria-ribosomal-RNA, Journal of Infectious Diseases (Band 157), Nr. 2, Seite 280-286.
- Tang, Y.; Shigematsu, T.; Morimura, S. und Kida, K. (2005): Microbial community analysis of mesophilic anaerobic protein degradation process using bovine serum albumin (BSA)-fed continuous cultivation, Journal of Bioscience and Bioengineering, (Band 99), Nr. 2, Seite 150-164.
- Tebbe, C. C. und Vahjen, W. (1993): Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant-DNA from bacteria and a yeast, Applied and Environmental Microbiology (Band 59), Nr. 8, Seite 2657-2665.
- Thiele, J. H. und Zeikus, J. G. (1988): The anion-exchange substrate shuttle process - a new approach to 2-stage biomethanation of organic and toxic wastes, Biotechnology and Bioengineering (Band 31), Nr. 6, Seite 521-535.
- Vacca, D. J.; Bleam, W. F. und Hickey, W. J. (2005): Isolation of soil bacteria adapted to degrade humic acid-sorbed phenanthrene, Applied and Environmental Microbiology (Band 71), Nr. 7, Seite 3797-3805.
- Van Langerak, E. P. A.; Gonzalez-Gil, G.; Van Aelst, A.; van Lier, J. B.; Hamelers, H. V. M. und Lettinga, G. (1998): Effects of high calcium concentrations on the development of methanogenic sludge in upflow anaerobic sludge bed (UASB) reactors, Water Research (Band 32), Nr. 4, Seite 1255-1263.
- Van Lier, J. B.; Rebac, S.; Lens, P.; van Bijnen, F.; Elferink, S. J. W. H.; Stams, A. J. M. und Lettinga, G. (1997): Anaerobic treatment of partly acidified wastewater in a two-stage expanded granular sludge bed (EGSB) system at 8 degrees C, Water Science and Technology (Band 36), Nr. 6-7, Seite 317-324.
- Venter, J. C.; Remington, K.; Heidelberg, J. F.; Halpern, A. L.; Rusch, D.; Eisen, J. A.; Wu, D. Y.; Paulsen, I.; Nelson, K. E.; Nelson, W.; Fouts, D. E.; Levy, S.; Knap, A. H.; Lomas, M. W.; Nealson, K.; White, O.; Peterson, J.; Hoffman, J.; Parsons, R.; Baden-Tillson, H.; Pfannkoch, C.; Rogers, Y. H. und Smith, H. O. (2004): Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea, Science (Band 304), Nr. 5667, Seite 66-74.
- Visuvanathan, S.; Moss, M. T.; Stanford, J. L.; Hermontaylor, J. und Mcfadden, J. J. (1989): Simple enzymic method for isolation of DNA from diverse bacteria, Journal of Microbiological Methods (Band 10), Nr. 2, Seite 59-64.

- Watanabe, K.; Kodama, Y. und Harayama, S. (2001): Design and evaluation of PCR primers to amplify bacterial 16S ribosomal DNA fragments used for community fingerprinting, *Journal of Microbiological Methods* (Band 44), Nr. 3, Seite 253-262.
- Waters, E.; Hohn, M. J.; Ahel, I.; Graham, D. E.; Adams, M. D.; Barnstead, M.; Beeson, K. Y.; Bibbs, L.; Bolanos, R.; Keller, M.; Kretz, K.; Lin, X. Y.; Mathur, E.; Ni, J. W.; Podar, M.; Richardson, T.; Sutton, G. G.; Simon, M.; Soll, D.; Stetter, K. O.; Short, J. M. und Noordewier, M. (2003): The genome of *Nanoarchaeum equitans*: insights into early archaeal evolution and derived parasitism, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 100), Nr. 22, Seite 12984-12988.
- White, D. C.; Flemming, C. A.; Leung, K. T. und Macnaughton, S. J. (1998): In situ microbial ecology for quantitative appraisal, monitoring, and risk assessment of pollution remediation in soils, the subsurface, the rhizosphere and in biofilms, *Journal of Microbiological Methods* (Band 32), Nr. 2, Seite 93-105.
- Whitehead, T. R. und Cotta, M. A. (1999): Phylogenetic diversity of methanogenic archaea in swine waste storage pits, *FEMS Microbiology Letters* (Band 179), Nr. 2, Seite 223-226.
- Whitford, M. F.; Forster, R. J.; Beard, C. E.; Gong, J. H. und Teather, R. M. (1998): Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes, *Anaerobe* (Band 4), Nr. 3, Seite 153-163.
- Willems, A.; Moore, W. E. C.; Weiss, N. und Collins, M. D. (1997): Phenotypic and phylogenetic characterization of some *Eubacterium*-like isolates containing a novel type B wall murein from human feces: Description of *Holdemania filiformis* gen. nov., sp. nov., *International Journal of Systematic Bacteriology* (Band 47), Nr. 4, Seite 1201-1204.
- Wilson, I. G. (1997): Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification, *Applied and Environmental Microbiology* (Band 63), Nr. 10, Seite 3741-3751.
- Woese, C. R. (1970): Organization and control in prokaryotic and eukaryotic cells, 20th symposium society for General Microbiology, Cambridge University Press.
- Woese, C. R. (1987): Bacterial Evolution, *Microbiological Reviews* (Band 51), Nr. 2, Seite 221-271.
- Woese, C. R.; Kandler, O. und Wheelis, M. L. (1991): A natural classification, *Nature* (Band 351), Nr. 6327, Seite 529-529.
- Wu, X. L.; Friedrich, M. W. und Conrad, R. (2006): Diversity and ubiquity of thermophilic methanogenic archaea in temperate anoxic soils, *Environmental Microbiology* (Band 8), Nr. 3, Seite 394-404.
- Zehnder, A. J. B. und Wuhrmann, K. (1977): Physiology of a *Methanobacterium* strain AZ, *Archives of Microbiology* (Band 111), Nr. 3, Seite 199-205.



## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1: Phylogenetischer Stammbaum der Bacteria abgeleitet aus dem Vergleich der 16S rDNA Sequenzen.....   | 4  |
| Abb. 2: Phylogenetischer Stammbaum der Archaea entwickelt aus dem Vergleich der 16S rDNA Sequenzen.....  | 8  |
| Abb. 3: Der Abbauprozess von organischen Verbindungen unter anaeroben Bedingungen.....   | 21 |
| Abb. 4: Aufbau des CSTR Biogasreaktors (CSTR, Monovergärung von Mais- und Rübensilage mit Gülle) (1) Reaktorraum, (2) Substratzufuhr, (3) Rührwerk, (4) Abfluss..... | 31 |
| Abb. 5: Aufbau des kombinierten Systems aus <i>leach-bed</i> Reaktor und Anaerobfilter .   | 32 |
| Abb. 6: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylums Euryarchaeota der Domäne Archaea. ....  | 41 |
| Abb. 7: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Clostridia der Domäne Bacteria. ....   | 43 |
| Abb. 8: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Mollicutes der Domäne Bacteria. ....   | 44 |
| Abb. 9: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Phylum Bacteroides der Domäne Bacteria. ....  | 45 |
| Abb. 10: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Alphaproteobacteria der Domäne Bacteria.....  | 46 |
| Abb. 11: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Gammaproteobacteria der Domäne Bacteria.....  | 46 |
| Abb. 12: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Epsilonproteobacteria der Domäne Bacteria. ....   | 47 |
| Abb. 13: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylum Spirochaetes der Domäne Bacteria.....   | 48 |
| Abb. 14: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylum Chloroflxi der Domäne Bacteria.....   | 48 |
| Abb. 15: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb des Phylum Fibrobacteria der Domäne Bacteria.....  | 49 |
| Abb. 16: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der taxonomisch nicht klassifizierten Bacteria. ....   | 50 |
| Abb. 17: Phylogenetische Beziehung der ATB-Klone innerhalb des Phylums Euryarchaeota der Domäne Archaea .....  | 53 |
| Abb. 18: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Clostridia der Domäne Bacteria. ....  | 55 |
| Abb. 19: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Bacilli der Domäne Bacteria.....  | 57 |
| Abb. 20: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Mollicutes der Domäne Bacteria. ....  | 57 |
| Abb. 21: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Phylum Bacteroides der Domäne Bacteria. ....   | 58 |

---

|  |    |
|--|----|
| Abb. 22: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Alphaproteobacteria der Domäne Bacteria.....                      | 59 |
| Abb. 23: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Gammaproteobacteria der Domäne Bacteria.....                      | 60 |
| Abb. 24: Phylogenetische Beziehung der ATB-KS-Klone innerhalb der Klasse Deltaproteobacteria der Domäne Bacteria.....                      | 61 |
| Abb. 25: Phylogenetische Beziehung ATB-KS-Klone innerhalb der Phylum Spirochaetes der Domäne Bacteria.....                                 | 61 |
| Abb. 26: Phylogenetische Beziehung der ATB-Klone innerhalb des Phylums Euryarchaeota der Domäne Archaea. ....                              | 65 |
| Abb. 27: Der Effekt von CTAB bei der Reinigung von DNA aus Probenmaterial aus einem Biogasreaktor.....                                     | 72 |
| Abb. 28: Eignung der unter Verwendung von CTAB gereinigten DNA für die PCR...  | 74 |
| Abb. 29: Vergleich der Bindungsstellen für die Primer 69F und Arche2F zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von methanogenen Archaea..... | 75 |
| Abb. 30: Vergleich der Bindungsstellen für den Primer ARC934R zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von methanogenen Archaea. ....        | 76 |
| Abb. 31: Vergleich der Bindungsstellen für den Primer 16S-F zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von Bacteria.....                       | 78 |
| Abb. 32: Vergleich der Bindungsstellen für den Primer 16S-R zum spezifischen Nachweis der 16S rDNA von Bacteria.....                       | 78 |
| Abb. 33: Der Einfluss der Zyklenzahl auf die Produktbildung bei der Amplifikation von bakterieller 16S rDNA.....                           | 79 |

---

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tab. 1: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für methanogene Archaea. ....  | 38 |
| Tab. 2: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für fermentative Bacteria. ....  | 39 |
| Tab. 3: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für methanogene Archaea. ....  | 52 |
| Tab. 4: Übersicht über die Verteilung der OTU und der entsprechenden Anzahl an Klonen in der 16S rDNA Bank spezifisch für fermentative Bacteria (CSTR-Biogasreaktor im übersäuerten Zustand). .... | 52 |
| Tab. 5: Übersicht über die in den zwei 16S rDNA Bibliotheken detektierten taxonomischen Gruppen. ....  | 63 |
| Tab. 6: Häufigkeit der detektierten Archaea OTU innerhalb der untersuchten Biogasreaktoren. ....   | 69 |

## Anhang

### 16S rDNA Nukleotidsequenzen (Archaea)

#### >ATB-KS-0076 [EF686880]

TTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTAGGGAAGGGGATAATCCCGGGAAA  
CTGGGGATAATACCCTATAGGTTACAGATGCTGGAATGCTCTGCAATCAAAAGTTCCGGCGCCCTAGGAT  
GGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAAGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGGG  
AGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTT  
TACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAAACCTCGAGTGCCCTGTAAATGCAGGCTGTTTCTAGATGCCTAAAAC  
ACATCTGGAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGC  
CACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTCTCTTGGGAAATCTGGCGGGCTTAACCG  
TCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGA  
AATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGAC  
GAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAAACTATGCGCGTTAGGTGTA  
TCGGTGACCACGAGTTACCGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAACGTGCCGCTGGGAAGTACGGTCGCA  
AGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

#### >ATB-KS-0077 [EF686889]

TGCTCAGTAACACGTGGACAACCTACCCTTGGGTCCGGCATAATCCTGGGAAACTGGGAATAATTCCGGA  
TAGGTCACCGATGCTGGAATGCGCGGTGGCCGAAAGCTCCGGCGCCCGAGGATGGGTCTGCGGCCTATCA  
GGGTTGTAGTGGGTGTAACGTACCTACTAGCCTACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGA  
TGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGTGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGAAACC  
GTGATAAGGGGATCTCGAGTGCCAGCATATAATGTTGGCTGTCCAGATGCCTAAAAAGCATCTGTTAGCA  
AGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAACACCGGCGGCCGAGTGTTAACCGCTATTATTGG  
GTCTAAAGGGTCTGTAGCCGGCCAGGTAAGTCCCTTGGGAAATCTGGCAGCTCAACTGTCAGGCTGCTAG  
GGGATACTGTTTGGCTTGGGACCGGGGAGAGGTGAGAGGTACCTTGGGGGTAGGGGTGAAATCTTGTGATC  
CTCGAGGGACCACCAGTGGCGAAGGCGTCTCACCAGAACGGGTCCGACGGTAAGGGACGAAAGCTAGGGG  
CACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCTAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTCAGTCACGGTGCG  
ACCGTGATTGGTGCCGTAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTATGGCCGAAGGCTGAAACTT  
AAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

#### >ATB-KS-0078 [EF686881]

CGAGAGGGTTCCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTAGGGAAGGGGATAACC  
CCGGGAAACTGGGGATAATACCCTATAGGTTACAGATGCTGGAATGCCCTGTAAACCAAGTTCCGGCGC  
CCTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAAGCCAGTAATCGGTACGG  
GTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGC  
GAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAAACCTCGAGTGCCCTGTAAACGCAGGCTGTTTCTAGGTG  
TCTAAACACACCTGGAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCGGCTCAA  
GTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTCTCTTGGGAAATCTGGCGG  
CTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTTCGGGGGT  
AGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCCCTGGGGAAAGGCGCCTCCCAAACGGCTTCGAAGTGAGGA  
ACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAAACGATGCGCGTTAGGTTT  
GGGGCCCGAGTTACCGAGGGCCGAAGGGAACCGGAAACGGCCCTGGGAAGTACGGTTCGCAAGGCTGAA  
ACTTAAAGGAATTGGGGGGGAGCA

#### >ATB-KS-0085 [EF686886]

GGTTCAAGACCTTCGGCGTACTGCTCAGTAAACACGTGGACAATTCTGCCTTGAAGTGGAGAATAATCCC  
CGGGAAACTGGGGGTAATACTCCATAGTTTCGTTAATACTGGAATGTTTTTCGAACGAAAGATCCGTCGCT  
TCAGGATGAGTCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAGTTGCCCAACAAGCCTGTAATCGGTACGGG  
TTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCG  
AAAACCTTTACCATGCGGGCAACCGTGATAAGGAAACCCCGAGTGCCAGCACAGGCTGGCTGTCCGCCAGT  
TTAAACAACCTGGCGAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGTAATACCGGCGGCTCGAG  
TGGTGGCCGCTATTACTGGGCTTAAAGGGTCCGTAGCTTGATAATAGGGTCCCTTGAGAAATCCGCCGCG  
TTAACTGGCGGGCGTTTACGGGGAAACTTGTTTTCTAGGGACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTGCCGGGGTA  
GGAGTGAAATCCTGTAATCCCGGTGGGACCACCTATGGCGAAGGCATCTCACCAGAACGGGTCCGACAGT  
GAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCAGCTGTAAACTATGTGCGTT  
AGGTGTGTGAGTGACCACGTGTCACTGAGGTGCCGAAGGGGAAACCGTGAAACGCACCGCCTGGGGAGTAC  
GGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0088 [EF686888]**

AACATGGCGTACTGCTCAGTAACCACGTGGATAACCTGCCTTTGGGTCTGGGATAACCCCGGGAACTGG  
GGATAATACCGGATAACGCATATATGCTGGAATGCTTTATGCGTAAAATGGATTCTGCTGCCCAAGGATG  
GGTCTGCGGCCCTATCAGGTAGTAGTGGGTGTAATGTACCTACTAGCCTACAACGGGTACGGGTTGTGAGA  
GCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACTTT  
ACAATGCGGGAAACCGTGATAAGGGGACGCCGAGTGCCAGCATCATATGCTGGCTGTCCAGATGTGTAAA  
ATACATCTGTTAGCAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAACACCGGCGGGCCGAGTGGT  
GATCGTGATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGGTTTGGTCAGTCCTCCGGGAAAATCTGATGGCTCAA  
CCATTAGGCTTTTCGGGGGATACTGCCAGGCTTGGAACCGGGAGAGGTAAGAGGTAACAGGGGTAGGAG  
TGAAATCTTGTAATCCCTGTGAGACCACCTGTGGCGAAGGCGTCTTACCAGAACGGGTTTCGACGGTGAGG  
GACGAAAGCTGGGGGCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGT  
GTCAGGCATGGCGCGACCGTGTCTGGTGCCGAGGGAAGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCC  
GCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0141 [EF686884]**

GAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTAAGGAAGGGGAT  
AATCCCGGAAACTGGGGATAATACCCTATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGTAATCAAAAGTTCGGA  
CGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAAGCCAGTAATCGGTA  
CGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGG  
CGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTGCTGTATACGCAGGCTGTCCAG  
GTGCCTAAAACACACCTGAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCT  
CGAGTGGTGGCCGCTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGGTTTGTAAAGTCTCTTGGGAAATCTGG  
CGGCTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTTCGGG  
GGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGCTTCGA  
CAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAGCCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAGCCGTAAACGATGTG  
CGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAACGTACCGCCTGGGAA  
GTACAGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0151 [EF686883]**

CCTGCGAGTCGAGAGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTAGGGAAGG  
GGATAACCCCGGGAAACTGGGGATAATACCCTATAGGTTACAGATGCTGGAATGCCCTGTAACCCAAAGT  
TCCGGCGCCCTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAAGCCAGTAAT  
CGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCA  
GCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTGCTGTAAACGCAGGCTG  
TTCAGGTGTCTAAAACACACCTGGAGAAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGG  
CGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGGGTTGTAAAGTCTCTTGGGAAA  
TCTGGCGGCTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACT  
TCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGC  
TTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAGCCGTAAACG  
GTACGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTTACCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAACGTGCCGCCT  
GGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0152 [EF686891]**

GATTAAGCCATGCGAGTCGAACGAATTTAGATTCTGTTGGCGTACGGCTCAGTAACACGTGGATAACCTACC  
CTTAGGACTGGGATAACTCTGGGAAACTGGGGCTAATACCGGATAGATGATTTTTCTTGAATGGGATTT  
TGTTTTAAATGTTTTTTTCGCCTAAGGATGGGTCTGCGGCAGATTAGGTAGTTGGTTAGGTAATGGCTTACC  
AAGCCTATGATCTGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGAACCTGAGACAAGGTTCCAGGCCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCACAATGTACGAGAGTGCATGGGGGGATCCCAAGTGCTATTTC  
TTAACGGGATAGCTTTTTCTTAAGTGTA AAAAGCTTTTGGAAATAAGAGCTGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCG  
CCGCGGTAACACCGGCAGCTCTAGTGGTAGCTGTTTTTTATTGGGCCTAAAGCGTTCGTAGCCGGTTTGAT  
AAGTCTCTGGTGAAATCCTGTAGCTTAACTGTGGGAATTGCTGGTGATACTGTTGAACTTGAGGTGCGGGA  
GAGGTTAGCGGTACTCCAGGGTAGAGGTGAAATCTGTAATCCTGGGAGGACCACCTGTGGCGAAGGCG  
GCTAACTGGAACGAACCTGACGGTGAGGGACGAAAGCTAGGGGCGCGAACCGGATTAGATACCCGGGTAG  
TCCTAGCCGTAAACGATGCGGACTTGGTGTTGGGGTGGCTTTGAGCTGTTTCGGTGCCGTAGGGAAGCTG  
TTAAGTCCGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGACTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCAA

**>ATB-KS-0155 [EF686892]**

TGATTAGCCATGCGAGTCGAACGAGTTTGGGCTCGTGGCGTACGGCTCAGTAACACGTGGATAACCTACC  
CTTAGGACCGGGGATAACCTTGGGAACTGAGGATAATACTGGATAGGCAATTTTTCCTGTAATGGTTTTT  
TGTTTAAATGTTTTTTCGCCTAAGGATGGGTCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGGTTAGGTAATGGCTTACC  
AAGCCGTTGATCGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGAACCTGAGACAAGGTTCCAGGCCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCGCAATGTGAGAAATCGCGACGGGGGGATCCCAAGTGCCATTC  
CTAACGGGATGGCTTTTTCATTAGTGTAAGAGCTTTTGGAAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCG  
CCGCGGTAACACCGGCAGCTCTAGTGGTAACAATTTTATTGGGCCTAAAGCGTCCGTAGCCGGTTTAAT  
AAGTCTCTGGTGAAATCCTGTAGCTTAACGTGGGAATTGCTGGAGATACTATTAGACTTGAGACCGGGA  
GAGGTTAGAGGTACTCCAGGGTAGAGGTGAAATCTGTAAATCCTGGGAGGACCGCTGTTGCGAAGGCG  
TCTAACTGGAACGGTTCTGACGGTGAGGGACGAAAGTTAGGGGCGCGAACCGGATTAGATAACCGGGTAG  
TCCTAACTGTAAACGATGCGGACTTGTTGTTGGGGTGGCTTTGAGCTGCTCCAGTGCCGAAGGGAAGCTG  
TTAAGTCCGCCGCTGGGAAGTACGGTCGCAAGACTGAACTTAAAGGAATTGGCG

**>ATB-KS-0156 [EF686879]**

TGACTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAGGGAAGGGGATAATCCCGGGAACTGGGGATATACCTATAGGTTACAGATGCTGGAATGCTCTGTA  
ATCAAAAGTTCCGGCGCCCTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAA  
GCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTA  
CGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCGTGTA  
TGCAGGCTGTTTCAGATGCCTAAAACACATCTGGAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGG  
TAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTCT  
CTTGGGAAATCTGGCGGCTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGTG  
AGGGGTACTTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAAATCCTCGAGGGACCACTGTGGCGAAGGCGCCTCAC  
CAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAACCGGATTAGATAACCGGGTAGTCCAG  
CCGTAAACTATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTTACCGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAAC  
GTGCCGCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGAATTGGCG

**>ATB-KS-0162 [EF686890]**

TGATAAGCCATGCGAGTCGAGAGTCGTAATGGACTCGGCGGACTGCTCAGTAACACGTGGATAACGTGCC  
CTTAAGAGGAGGATAATCTCGGGAAATTGAGGATAATACTCCATAGATCATGGGATCTGGAATGACCCAT  
GGTTCAAAGTTCCGGCGCTTAAGGATCGGTCTGCGGCCTATCAGGTAGTAGTAGGTGTAACGTACCTACT  
AGCCTACGACGGGTATGGGCCTTGAGAGAGGGAGCCCAGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGTCGCGAAAACCTTACAATGGGGGCAACCCCGATGAGGGGAATTCCTAGTGCTAGCAC  
ATTTGTGTTAGCTTTTCTTTAGCTTAGAAAACTAGAGGAATAAGGGCTGGGTAAAGACGGGTGCCAGCCGC  
CGCGGTAATACCTGCAGCCCAAGTGGTGGTTCGATTTTATTGAGTCTAAAACGTTTCGTAGCCGGTTCCGTA  
AATCTTTGGGTAAGTCGGGGGGCTTAACCTCCCGACTTCCGAGGAGACTGCCGAACTTGGGACCGGGAGA  
GGCTAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGGTAATACTGTAAATCCTAGAAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCGTC  
TAGCTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGTGCGAAACGGGATTAGATAACCCGGTAGTC  
CAGGGTGTAACGCTGCAGACTTGTTGTTGGAGGCCCTTTGGGGGCATCCAGTGCCGGAGAGAAGTTGTT  
AAGTCTGCTACTTGGGGAGTACGTCCGCAAGGATGAACTTTAAAGGAATTGGC

**>ATB-KS-0170 [EF686887]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCATATGTTCTTCGTGAACATGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTG  
CCCTTGGGTCTGGGATAACCCCGGAACTGGGGATAATACCGGATAACGCATATATGCTGGAATGCTTT  
ATGCGTAAAATGGATATGTCTGCCCAAGGATGGGTCTGCGGCCTATCAGGTAGTAGTGGGTGTAATGTAC  
CTACTAGCCTACAACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAG  
GCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGAAACCGTGATAAGGGGACACCGAGTGCC  
AGCATCATATGCTGGCTGTCCAGATGTGTAAAATACATCTGTTAGCAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCA  
GCCGCCGCGGTAACACCGGCGGCCCCGAGTGGTGATCGTGATTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGGTT  
TGGTCAGTCCTCCGGGAAATCTGATGGCTCAACCATTAGGCTTTTCGGGGGATACTGCCAGGCTTGGAACC  
GGGAGAGGTAAGAGGTACTACAGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTAATCCCTGTGAGACCACCTGTGGCGAA  
GGCGTCTTACCAGAACGGGTTTCGACGGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGCGACGAACCGGATTAGATAACCCGG  
GTAGTCCCAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTCAGGCATGGCGCGACCGTGCTGGTGCCGACGGGA  
AGCCGTGAAGCGAGCCACCTGGGGAAGTACGGGCCGCAAGGCTGA

**>ATB-KS-0188 [EF686882]**

TGCTCAGTAACACGTGGATAACCCTGCCCTAGGGAAGGGGATAACCCCGGAACTGGGGATAATACCCT  
ATAGGTTACAGATGCTGGAATGCCCTGTAACCCAAAGTTCCGGCGCCCTAGGATGGATCTGCGGCCGATT  
AGGTAGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAAGCCAGTAATCGGTACAGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGT  
TGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACTTTACAATGCGGGCAACC  
GTGATAAGGGAACCTCGAGTGCCTGTAAACGCAGGCTGTTTCAGGTGTCTAAAACACACCTGGAGAAAAGG  
CCGGGCGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAA  
AGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTCTCTTGGGAAATCTGGCGGCCTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATA  
CTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAG  
GGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAA  
CCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAAACGATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTTAC  
CGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAACGTGCCGCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGA  
ATGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0221 [EF686885]**

CCTCGCCATACTGCTCAGTAACACGTGGTTAACCTGCCCTAAGGTGGAGAATACTCCCGGAAACTGGGG  
CTAATGCTCCATAGTGGATATGTCTTGAATGGTATATCCTCGAAAGATCCGTCGCCTTAGGATGGGACT  
GCGTCCGATTAGGTTGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGCCATTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAG  
ATCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGCAAACCTTTACAAT  
GCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTGCCTGTTCGATGCAGGCTGTTTCATATATCTAAATCATATGT  
GAAGAAAGGGCAGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTAT  
TACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTGACTGTTAGGTCTCTTGGGAAATCTTCACGCTCAACGTGAAGGC  
GTCTAAGAGATAACCGGCAGTCTTGGAACCTGGGAGAGGTAAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTT  
GTAATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGTTTACCAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGC  
TGGGGGAGCAAACGGGATTAGATAACCCGGTAGTCCCAGCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGTGTCGGTA  
ACCACGTGTTACTGATGCGCCGAAGAGAAATCGTGAAACGCACCACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTG  
AAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0441 [EF686895]**

TGACTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGTGTAAGACCTCGGCATACTGCTCAGTAACACGTGGTTAACCTGCC  
CTAAGGTGGAGAATACTCCCGGAAACTGGGGCTAATGCTCCATAGTGGATATGTCTTGAATGGTATAT  
CCTCGAAAGATCCGTCGCCTTAGGATGGGACTGCGTCCGATTAGGTTGTTGGCGGGGTAACGGCCACCA  
AGCCATTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGATCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGCAAACCTTTACAATGCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTGCCTGTCTG  
ATGCAGGCTGTTTCATATATCTAAATCATATGTGAAGAAAGGGCAGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTATTACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTGACTGTTAGGTC  
TCTTGGGAAATCTTCACGCTCAACGTGAAGGCGTCTAAGAGATAACCGGCAGTCTTGGAACCTGGGAGAGGT  
AAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTAATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGTTTA  
CCAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACGGGATTAGATAACCCGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGTGTCGGTAACCACGTGTTACTGATGCGCCGAAGAGAAATCGTGAAA  
CGCACACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0465 [EF686893]**

TTTGCTCCCCGCCAATTCTTAAGTTTCAGCCATGCAAGTCGAGAGGTGTAAGACCTCGGCATACTGCT  
CAGTAACACGTGGTTAACCTGCCCTAAGGTGGAGAATACTCCCGGAAACTGGGGCTAATGCTCCATAGT  
GGATATGTCTTGAATGGTATATCCTCGAAAGATCCGTCGCCTTAGGATGGGACTGCGTCCGATTAGGTT  
GTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGCCATTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGATCCCGGAGATGGAT  
TCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGCAAACCTTTACAATGCGAGCAATCGTGAT  
AAGGAAACCTGAGTGCCTGTTCGATGCAGGCTGTTTCATATATCTAAATCATATGTGAAGAAAGGGCAGGG  
CAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTATTACTGGGTTTAAAGC  
GTCCGTAGCTTGACTGTTAGGTCTCTTGGGAAATCTTCACGCTCAACGTGAAGGCGTCTAAGAGATAACCG  
GCAGTCTTGGAACCTGGGAGAGGTAAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTAATCCTCGAGGGA  
CGACCTATGGCGAAGGCAGTTTACCAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACGG  
GATTAGATAACCCGGTAGTCCCAGCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGTGTCGGTAACCACGTGTTACTGA  
TGCGCCGAAGAGAAATCGTGAAACGCACCACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATT  
GGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0468 [EF686896]**

GAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCCCTAAGGAAGGGGAT  
AATCCCGGAAACTGGGGATAATACCCTATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGTAATCAAAAGTTCCGA  
CGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACAAGCCAGTAATCGGTA  
CGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGG  
CGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTGCCTGTATACGCAGGCTGTCCAG  
GTGCCTAAAACACACCTGAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGGCT  
CGAGTGGTGGCCGCTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGGTTTGTAAAGTCTCTTGGGAAATCTGG  
CGGCTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTTCGGG  
GGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGCTTCGA  
CAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAGCCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCAGCCGTAAACGATGTG  
CGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAACGTACCGCCTGGGAA  
GTACAGTCGCAAGGCTGAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KS-0470 [EF686894]**

CCTCGCCATACTGCTCAGTAACACGTGGTTAACCTGCCCTAAGGTGGAGAATACTCCCGGAAACTGGGG  
CTAATGCTCCATAGTGGATATGTCTGGAATGGTATATCCTCGAAAGATCCGTCGCCCTTAGGATGGGACT  
GCGTCCGATTAGGTTGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAGCCATTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAG  
ATCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGCAAACCTTTACAAT  
GCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCGTGAGTGCCTGTGATGCAGGCTGTTCATATATCTAAATCATATGT  
GAAGAAAGGGCAGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTAT  
TACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTGAAGTCTCTTGGGAAATCTTCACGCTCAACGTGAAGGC  
GTCTAAGAGATACCGGCAGTCTTGGAAGTGGGAGAGGTAAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTT  
GTAATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGTTTACCAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGC  
TGGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCCAGCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGTGTCGGTA  
ACCACGTGTTACTGATGCGCCGAAGAGAAATCGTGAAACGCACCACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTG  
AAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2942-A18 [EF680353]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGTGTAAGACCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGACAATCTGCC  
CTGAAGTGGAGGATAATCCCGGGAAACTGGGGGTAATACTCCATAGTTCTGTGCTGACTGGAATGTTATGC  
GAACGAAAGATCCGTCGCTTCAGGATGAGTCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCTGTCTATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACCATGCGGGCAACCGTGATAAGGAAACCCCGAGTGCCAGCAC  
AGGCTGGCTGTCCGCCAGTGTAATAAAGTGGTGAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTATTACTGGGCTTAAAGGGTCCGTAGCTTGATATGCAAGTC  
TCTTGAGAAATCCGCCAGCTTAACTGGTGGGCGTTACGGGGAAACTGCATTTCTAGGGACCGGGAGAGGT  
GAGAGGTACTGCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCCGGTGGGACCACCTATGGCGAAGGCATCTCA  
CCAGAACGGGTCCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCTGTAAACGATGCGCGTTAGGTGTGTGTCAGTGACCACGTGTCACTGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGCGCCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGGA

**>ATB-KM-2945-A05 [EF680344]**

TGACTAAGCCATGCAAGTCGAATGTAGCAATACATGGCGAACTGCTCAGTAACACGTGGACAACCTGCCC  
TTAGGTTGGGTATAAACC CGGAAACTGGGTATAATACCCGATAGGTCTCGATTGCTGGAATGCATCGAG  
ATTTAAAGCTCCGGCGCCTAAGGATGGGTCTGCGGCCATCAGGTAGTAGTGGGTGTAGCGTACCTACTA  
GCCTACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTA  
CGGGGTGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCTGGCAACAGCGATAAGGGAACCTCGAGTGCCAGGTTA  
CAAATCTGGCTGTGAGATGCCTAAAAAGCATTTTCATAGCAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCC  
GCGGTAACACCGGCGGCTCGAGTGGTAACCGTTATTATTGGGTCTAAAGGGTCTGTAGCCGGCCGGATAA  
GTCTCTTGAGAAATCTGGCAGCTTAACTGTGAGGCTTTTACGGAGATACTGTCTGGCTCGAGGCCGGGAGA  
GGTGAGAGGTACTTCAGGGGTAGGGGTGAAATCTTGTAATCCTTGAAAGGACCACAGTGCCGAAGGCGTC  
TCACCAGAACGGACCTGACGGCAAGGGACGAAAGCTAGGGGACAGTACCGGATTAGATACCCGGGTAGTC  
CTAGCCGTAAACGATACTCGCTAGGTGTGCGCCACGGTGCGACCGTTGTGCGGTGCCGTAGGGAAGCCGTG  
AAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA



**>ATB-KM-2947-A01 [EF680342]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGAC  
CTAAGGAAGGGGATAACTCCGGGAACTGGGGATAATACCCATAGGTTACGGGTGCTGGAATGCCCTGT  
AACCGAAAGTTCGACGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTCGGGGTAATGGCCCAACA  
AGCCAGTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAT  
ATGCAGGCTGTCCAGGTGTCTAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCAGCTTAACTGTTCGGGCGTCTAAGGGATACTGGTAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTCACCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2951-A03 [EF680343]**

TGACTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGAC  
CTAAGGWAGGGGATAACTCCGGGAACTGGGGATAATACCCATAGGTTACGGGTGCTGGAATGCCCTGT  
AACCGAAAGTTCGACGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTCGGGGTAATGGCCCAACA  
AGCCAGTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAT  
ATGCAGGCTGTCCAGGTGTCTAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCAGCTTAACTGTTCGGGCGTCTAAGGGATACTGGTAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTCACCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2958-A09 [EF680346]**

CGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATACCCCGGGAACTGGGTATAATACCCATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGT  
AATCGAAAGTTCGACGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTCGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCAGTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAT  
ATGCAGGCTGTCCAGGTGTCTAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTCGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCAGCTCAACTGTTCGGGCGTCTAAGAGATACTGGCGATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCAACGACCACGAGTCGTTGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2960-A11 [EF680347]**

TGACTAAGCCATGCAAGTTGAATGTTCTTCGTGAACATGGCGGACTGCTCAGTAACACGTGGACAACCTA  
CCCTTGGGTCCGGCATAATCCTGGGAACTGGGAATAATTCCGGATAGGTCACCGATGCTGGAATGCGCG  
GTGGCCGAAAGCTCCGGCGCCCGAGGATGGGTCTGCGGCCTATCAGGGTTGTAGTGGGTGTAACGTACCT  
ACTAGCCTACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCCGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGC  
CCTACGGGGTGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGAAACCGTGATAAGGGGATCTCGAGTGCCAG  
CATATAATGTTGGCTGTCCAGATGCCTAAAAAGCATCTGTTAGCAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGC  
CGCCGCGGTAACACCGGCGGCCCCGAGTGGTAACCGCTATTATTGGGTCTAAAGGGTCTGTAGCCGGCCAG  
GTAAGTCCCTTGGGAAATCTGGCAGCTCAACTGTCAGGCTGCTAGGGGATACTGTTTGGCTTGGGACCGG  
GAGAGGTGAGAGGTACCTTGGGGGTAGGGGTGAAATCTTGTGATCCTCGAGGGACCACAGTGGCGAAGG  
CGTCTCACCAGAACGGGTCCGACGGTAAGGGACGAAAGCTAGGGGACGAAACCGGATTAGATACCCGGGT  
AGTCTAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTCAGTCACGGTGCGACCGTGATTGGTGCCGTAGGGAAGC  
CGTGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTATGGCCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2986-A14 [EF680350]**

AACACGTGGATAACCTGCCCTAAGGAAGGGGATAACCCCGGGAACTGGGGATAATACCCTATAGGTTAC  
AGATGCTGGAATGCCCTGTAACCCAAAGCTCCGGCGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTG  
TTGGGGTAACGGCCCCAACAAGCCAGTAATCGGTACGGGTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTG  
AGACACGAATCCAGGCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGG  
GAACCTCGAGTGCCTGTACATGCAGGCTGTTCTGGGTGTCTAAAAACACACCTGAAGAAAGGGCCGGGCAAG  
ACCGGTGCCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTC  
GTAGCTGGGTGTTAAGTCTCTTGGGAAATCTGACGGCTCAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAA  
TCTTGGAACCGGGAGAGGTGAGGGGTACTTCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCAC  
CTGTGGCGAAGGCGCCTCACCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATT  
AGATACCCGGGTAGTCCCAGCCGTAAACGATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTCACCGAGGTG  
CCGAAGGGAAACCGTGAAACGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCG  
GGGGAGCA

**>ATB-KM-2987-A12 [EF680348]**

TGTTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGGTAAGCCCTCGGCATACTGCTCAGTAACACGTGGTTAATCTGCCC  
TTGGGTGGAGGATACTCCCGGGAACTGGGGCTAATACTCCATAGTGAATGCATGCTGGAATGCTGCATT  
CTCGAAAGATTTCATCGCCCCAAGGATGAGACTGCGTCCGATTAGGTCGTTGGTGGGGTAACGGCCCACCAA  
GCCTTTTATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGATCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCTA  
CGGGGCGCAGCAGGCGCGCAAACCTTTACAATGCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTGCCTGTCTGA  
TGCAGGCTGTTTCATATGTTTAAATTGCATGTGAAGAAAGGGCAGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCGCGG  
TAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTATTACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTGACTGTTAGGTCT  
CTTGGGAAATCTTTTGGCTTAACCAAAGGCGTCTAAGAGATACCGGCATTCTTGGAACGGGAGAGGTA  
AGCCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTAATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGCTTAC  
CAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACGGGATAGATACCCCGGTAGTCCCAGC  
CGTGAACAATGTGCGTTAGGTGTGTGCGTTACCACGCGTAACCTGATGCGCCGAAGAGAAATCGTGAAACG  
CACCACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2988-A23 [EF680354]**

TGATTAAGCCATGCGAGTSGAGAGGTGTAAGACCTCGGCATACTGNTCAGTAACACGTNGGTTAACCTKC  
CNTAAGGTGGAGAATACTCCCGGGAACTGGGGCTAATGCTCCATAGTGGAATHTCCTGGAATGGTATA  
TCCTCGAAAGATCSGTGCGCTTAGGATGGGACTGCGTCCGATTAGGTTGTTGGCGGGGTAACGGCCCACC  
AAGCCTTTTATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGATCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGCGCAAACCTTTACAATGCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTGCCTGTC  
GATGCAGGCTGTTTCATATATCTAAATCATATGTGAAGAAAGGGCAGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCCG  
GGTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTATTACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTGACTGTTAGGT  
CTCTTGGGAAATCTTCGCGCTCAACGTGAAGGCGTCTAAGAGATACCGGCAGTCTTGGAACGGGAGAGG  
TAAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTAATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGTTT  
ACCAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCC  
AGCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGTGTGCGTAACCACGTGTTACTGATGCGCCGAAGAGAAATCGTGAA  
ACGCACCACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2994-A17 [EF680352]**

TGACTAAGCCATGCAAGTCGAATGTAGCAATACATGGCGAACTGCTCAGTAACACGTGGACAACCTGCCC  
TTAGGACGGGGATAAACCCGGGAACTGGGTATAATACCCGATAGGTCTCGATTGCTGGAATGCATCGAG  
ATTTAAAGCTCCGGCGCCTAAGGATGGGTCTGCGGCCATCAGGTAGTAGTGGGTGTAGCGTACCTACTA  
GCCTACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCTA  
CGGGGTGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCTGGCAACAGCGATAAGGGAACCTCGAGTGCCAGGTTA  
CAAATCTGGCTGTGAGATGCCTAAAAAGCATTTTCATAGCAAGGGCCGGGCAAGACCCGGTGCCAGCCGCC  
GCGGTAACACCGGCGGCTCGAGTGGTAACCGTTATTATTGGGTCTAAAGGGTCTGTAGCCGGCCGGATAA  
GTCTCTTGAGAAATCTGGCGGCTTAACTGTCAGGCTTTTACAGGAGATACTGTCTGGCTCGAGGCCGGGAGA  
GGTGAGAGGTACTTCAGGGGTAGGGGTGAAATCTTGTAATCCTTGAAGGACCACAGTGCCGAAGGCGTC  
TCACCAGAACGGACCTGACGGCAAGGGACGAAAGCTAGGGGACGAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTC  
CTAGCCGTAAACGATACTCGCTAGGTGTGCGCCACGGTGCGACCGTTGTGCGGTGCCGTAGGGAAGCCGTG  
AAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-2996-A24 [EF680355]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAGGGAAGGGGATAACCCCGGGAACCTGGGGATAATACCCATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGT  
AATCCAAAGTTCCGACGCCCTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACA  
AGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTCCGAGTGCCTGTAA  
ATGCAGGCTGTTTCAGGTGCCTAAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCGCTTTTATTGGGCCTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCTGGCGGCTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACTATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTAACCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTGCCGCGCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3015-A29 [EF680357]**

TGATTAAGCCATGCGAGTCGAGAGTCGTAATGGACTCGGCGCACTGCTCAGTAACACGTGGATAACATAC  
CCTAAAGTGGAGCATAATCTCGGAAAACCTGAGGATAATACTCCATAGGTCACGAGATCTGGAAAGACTTG  
TGGCTCAAAGTTCCGGCGCTTTAGGATTGGTCTGCGGCCATCAGGTAGTAGTGGGTGTAACGGACCCAC  
TAGCCGATGACGGGTATGGGCCTTGAGAGAGGGAGCCAGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGTCGCGAAAACCTTCACAATGGAGGCAACTCCGATGAGGGAACTCCTAGTGCCAATG  
CATTTTGTGTTGGCTTTTCTTCAGCGTAGATAACTGTTGGAATAAGGGCTGGGTAAAGACGGGTGCCAGCC  
GCCGCGGTAATACCCGCAGCCCAAGTGGTGGTTCGATATTATTGAGTCTAAAACGTTTCGTAGCCGGTTCAA  
TAAATCTCTGGGTAAATCGGAGGGCTTAACCTTCCGAATTCCGGAGAGTCTGTTGAACTTGGGACCGGGA  
GAGGCAAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGGTAAAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCG  
TCTTGCTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGTGCGAAACGGGATTAGATACCCCGGTAG  
TCCAGGGTGTAACGCTGCAGAMTTGGTGTGGGAACCCCTTCGRGGGTGNTCANNCCGGAGAGAAGTWR  
TTAAGTNTSMTRCTTGGGGAGNANGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3026-A13 [EF680349]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCAAATGTTCTTCGTGAACATGGCGCAATGCTCAGTAACACGTGGATAACCTG  
CCCTCAGGTCCGGCATAATCTCGGAAAACCTGAGGATAAATCCGGATATCCCTTTTCTGTTGGAAGACTTA  
AAGGGACAAAGAATTTTCGCTGAGGATGGGTCTGCGGCCATCAGGTTGTAGGGGGTGTAAAGTACCTCC  
TGGCCGACGACGGGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCAGGAACTGTGATAAGGAGACACCGAGTGCTCGCA  
TCAAATGCGGGCTGTCCGCTTACTTAAATCGTAAGCGTTAGCAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCG  
CCGCGGTGATACCGGTGGCCCCGAGTGGTAGCCGCTTTTATTGGGTCTAAAGGGTCCGTAGCCGGTTCCGGT  
CAGTCCATTGGGAAATCCGGATGCTCAACATCCGGGCTCCCAGTGGATACTGCCGAACTTGGGATCGGGG  
GAGGTAAGAGGTACTATAGGGGTAGGAGTGAAATCTTGTAATCCCTGTGGGACCACCTGTGGCGAAGGCG  
TCTTACCAAACAGAGTCCGACGGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGCACGAACCGGATTAGATACCCGGGTAG  
TCCCAGCCGTAAACGATGCTCGCTAGGTGTCAGGCATGGCGTGACTGTGTTTGGTGCCGAAGGGAAGCCG  
TGAAGCGAGCCACCTGGGAAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3032-A34 [EF680358]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGTCGTAATGGACTCGGCGGACTGCTCAGTAACACGTGGATAACATGC  
CCTTAAGTGGAGGATAATCTCGGAAAATTGAGGATAATACTCCATAGATCATGAAATCTGGAATGATTCA  
TGGTTCAAAGTTCCGGCGCTTAAGGATTGGTCTGCGGCCATCAGATAGTAGTGGGTGTAACGTACCTAC  
TAGCCTATGACGGGTATGGGCCTTGAGAGAGGGAGCCAGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGTCGCGAAAACCTTCACACTGGGGGCAACCCCGATGAGGGAATTCCTAGTGCTAGCG  
CTTTTTGTGCTAGCTTTTCTTCAGTATAGATAGCTGGAGGAATAAGGGCTGGGTAAAGACGGGTGCCAGCC  
GCCGCGGTAATACCTGCAGCCCAAGTGGTGGTTCGATTTTATTGAGTCTAAAACGTTTCGTAGCCGGTTTGA  
TAAATCCTTGGGTAAATCGGAGAGCTTAACCTTTCCGACTTCCGAGGAGACTGTCAAACCTTGGGACCGGGA  
GAGGCAAGAGGTACTTGAGGGGTAGGGGTAAAATCCTGTAATCCTTTAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCG  
TCTTGCTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGTGCGAAACGGGATTAGATACCCCGGTAG  
TCCAGGGTGTAACGCTGCAGACTTGGTGTGGAGATCCTTCGTGGGTATTCACTGCCGGAGAGAAGTTG  
TTAAGTCTGCTACTTGGGGAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3034-A35 [EF680359]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCAGACCCCTCGGCGGACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGC  
CCTATGGTGGAGGATAACCCCGGGAACTGGGGATAATACTCCATAGATTAGAGAACTGGAATGTTCTT  
TAATCGAAAGTTCCGGCGCCATAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAAC  
AAGCCTGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGAATCTGAGACACGATTCAGGCCCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCAGGAACTGTGATAAGGGAAACCCGAGTGCCCGTA  
TACGCGGGCTGTCCAGGTGTCTAAAACGCATCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGC  
GGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGACCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGGACTCTTAGGT  
CTCTTGGGAAATCCCGCGGCTTAACCGTGGGGCGTTTAAAGAGATACTGAGAGTCTAGGAACCGGGAGAGG  
TAAGAGGTACTTCGGGGGTAGAAGTGAAATCTGTAAATCCTCGAGGGACCACCGATGGCGAAGGCATCTT  
ACCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGAACGAAAGCTGGGGGAGCGAACGGGATTAGATAACCCGGTAGTCCC  
AGCCGTAAACGATGCGCGTTAGGTGTACTGGTGACCACGAGTCACTGGGGGTGCCGAAGGGRAAACCGTG  
AAACGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3035-A08 [EF680345]**

TGACTAAGCCATGCGAGTCGAACGATCCTTCGGGGGTCTGGCGTACGGCTCAGTAACACGTGGATAACC  
TAACCTTAGGACTGGGATAACCCCTGGGAACTGGGGATAATACCGGATATGTAGGGCTGCCTGGAATGGT  
TCCCTATTGAAATGTTCCGACGCCTAAGGATGGATCTGCGGCAGATTAGGTAGTTGGCGGGGTAAATGCC  
CACCAAGCCAGTAATCTGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCGGAGATGGAACCTGAGACAAGGTTCCAG  
GCCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTCCGCAATGCACGAAAGTGCGACGGGGGAAACCCAAGTGCC  
ACTCTTAACGGGGTGGCTTTTTCTTAAGTGTA AAAAGCTTTTTGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCA  
GCCGCCGCGGTAACACCGGCAGCCCCAAGTGGTGGCCGTTTTTATTGGGCCTAAAGCGTTCGTAGCCGGCT  
TGATAAGTCTCTGGTGAAATCTCACGGCTTAACCGTGAGAATTGCTGGAGATACTATTAGGCTTGAGGCC  
GGGAGAGGTTAGCGGTACTCCCGGGGTAGGGGTGAAATCCTATAATCCCGGGAGGACCACCTGTGGCGAA  
GGCGGCTAACTGGAACGGACCTGACGGTGAGTAACGAAAGCCAGGGGCGCGAACCGGATTAGATAACCCGG  
GTAGTCCTGGCCGTAAACGATGTGGACTTGGTGTGGGATGGCTCCGAGCTGCCCCAGTGCCGAAGGGAA  
GCTGTTAAGTCCACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3055-B15 [EF680366]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATACCCCGGGAACTGGGTATAATACCTATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGT  
AATCGAAAGTTCCGACGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTGTTGTGTCGGGGTAATGGCCCAACA  
AGCCAGTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAT  
ATGCAGGCTGTCCAGGTGTCTAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTCGTAGCTGGGTGCTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCAGCTCAACTGTGCGGGCTTAAGAGATACTGGCGATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCAACGACCACGAGTCGTTGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3067-B17 [EF680367]**

CGACTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGTTCAAGACCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGACAATCTGCC  
CTGAAGTGGAGAATAATCCCGGGAACTGGGGGTAAATACTCCATAGTTTCGTTATTACTGGAATGTTTTTC  
GAACGAAAGATCCGTCGCTTCAGGATGAGTCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAATTGCCCAACA  
AGCCTGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCGGAGATGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACCATGCGGGCAACCGTGATAAGGAAACCCCGAGTGCCAGCAC  
AGGCTGGCTGTCCGCCAGTTTAAACAACCTGGCGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCGCTATTACTGGGCTTAAAGGGTCCGTAGCTTGATAATAGGGTC  
CCTTGAGAAATCCGCCGGCTTAACCTGGCGGGCGTTCAGGGGAACTTGTTTTCTAGGGACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTGCCGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCCGGTGGGACCACCTATGGCGAAGGCATCTCA  
CCAGAACGGGTCCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCCA  
GCTGTAAACTATGTGCGTTAGGTGTGTCACTGACCACGTGTCACTGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGCACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAaCTTAAAGGAATtGGCGGGgGAGCA

**>ATB-KM-3074-B07 [EF680364]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATAACCCCGGGAACTGGGTATAATACCCATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGT  
AATCGAAAGTTCCGACGCCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTCGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCAGTGATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAT  
ATGCAGGCTGTCCAGGTGTCTAAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTCGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCAGCTCAACTGTGCGGGCTCTAAGAGATACTGGCGATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCAACGACCACGAGTCGTTGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3076-B03 [EF680363]**

TGACTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAGGGAAGGGGATAACCCCGGGAACTGGGGATAATACCCATAGGTTACAGATGCTGGAATGCTCTGT  
AACCCAAAGTTCCGGCGCCCTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACA  
AGCCAGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAA  
ATGCAGGCTGTTTTAGGTGTTTTAAACCGCACCTGGAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTCGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCTGGCGGCTTAACCGTCAGGCGTCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCAAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACTATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTTACCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3114-B14 [EF680365]**

TGATTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGNTAACACGTGGATAACCTGC  
CCTAAGGAAGGGGATAACCCTCGGGAACTGAGGATAATACCCATAGGTTACCGATGCTGGAATGCTCGG  
TAACTCAAAGTTCCGGCGCCTTAGGATGGATCAGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAAC  
AAGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGTGAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAA  
CATGCAGGCTGTCTGGGTGTCTAAAAACACACCCAAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GGTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTCGTTAAGT  
CTCTTGGGAAATCCGGCGGCTTAACCGTCGGGCGTCTAAGAGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGG  
TGAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTC  
ACCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCC  
AGCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAA  
ACGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3125-B26 [EF680369]**

CGATTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAGGGAAGGGGATAACCCCGGGAACTGGGGATAATACCCATAGATTACAGATGCTGGAATGCCCTGT  
AATCCAAAGTTCCGACGCCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTTGTTGTTGGGGTAATGGCCCAACA  
AGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACTTCGAGTGCCTGTAA  
ATGCAGGCTGTTTCAGGTGCCTAAAAACACACCTGAAGAAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCGCTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTCGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCTGGCGGCTTAACCGTCAGGCGCTAAGGGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATAACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACTATGCGCGTTAGGTGTATCGGTGACCACGAGTTACCGAGGTGCCGAAGGGAAACCGTGAAA  
CGTGCCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3144-B21 [EF680368]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAACGATCCTTCGGGGTCGTGGCGTACGGCTCAGTAACACGTGGATAACCT  
AACCTTAGGACTGGGATAACCTCGGGAACTGGGGATAATACCGGATATGTAGGGCTGCCTGGAATGGTT  
CCCTATTGAAATGTTCCGACGCCTAAGGATGGATCTGCGGCAGATTAGGTAGTTGGCGGGGTAAATGCCC  
ACCAAGCCAGTAATCTGTACGGGTTGTGAGAGCAAGAGCCCCGAGATGGAACCTGAGACAAGGTTCCAGG  
CCCTACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCCGCAATGCACGAAAGTGCGACGGGGGAAACCCAAGTGCCA  
CTCTTAACGGGGTGGCTTTTCTTAAGTGTAAGAAAGCTTTTGGGAATAAGAGCTGGGCAAGACCGGTGCCAG  
CCGCCGCGGTAAACACCGGCAGCTCAAGTGGTGGCCGTTTTTATTGGGCCTAAAGCGTTTCGTAGCCGGCTT  
GATAAGTCTCTGGTGAATCTCACGGCTTAACCGTGAGAATTGCTGGAGATACTATTAGGCTTGAGGCCG  
GGAGAGGTTAGCGGTACTCCCGGGGTAGGGGTGAAATCCTATAATCCCGGGAGGACCACCTGTGGCGAAG  
GCGGCTAACTGGAACGGACCTGACGGTGAGTAACGAAAGCCAGGGGCGCAACCGGATTAGATACCCGGG  
TAGTCCTGGCCGTAAACGATGTGGACTTGGTGTTGGGATGGCTCCGAGCTGCCCCAGTGCCGAAGGGAAG  
CTGTTAAGTCCACCGCTGGGAAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTtAAAGGAATtGGCGGGGgAGCA

**>ATB-KM-3220-A25 [EF680356]**

TGATTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATACCTTCGGGAACTGAGGATAATACCTATAGGTTACCGATGCTGGAATGCTCGGT  
AACTCAAAGTTCGGGCGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGGAACCTCGAGTGCCTGTAC  
ATGCAGGCTGTCTGGGTGTCTAAACACACCCAAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTTATTGGGCTTAGAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCGGCTTAACCGTCGGGCGTCTAAGAGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGGGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3231-A16 [EF680351]**

CGATTAAGCCATGCGAGTCGAGAGTCGTAATGGACTCGGCGGACTACTCAGTAACACGTGGACAACGTGC  
CCTTAAGTGGGGGATAATCTCGGGAAATTGAGGATAATACCCATAGATCATGGCATCTGGAATGAGCTA  
TGGTTCAAAGTTCGGGCGCTTAAGGATCGGTCTGCGGCCATCAGGTAGTAGTGGGTGTAAAGTACCTAC  
TAGCCTATGACGGGTATGGGCCTTGAGAGAGGGAGCCAGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGTCGCGAAACCTTCACACTGGGGGCAACCCCGATGAGGGAATTCCTAGTGCTAGCT  
CTTTTTGAGTTAGCTTTTCTTTAGCGTAGATAACTAAAGGAATAAGGGCTGGGTAAAGACGGGTGCCAGCC  
GCCGCGGTAATACCTGCAGCCCAAGTGGTGGCCGATAGTATTGAGTCTAAAAACGTTTCGTAGCCGGTCTGA  
TAAATCTTTGGGTAAATCGGGAAGCTTAACTTTCCGACTTCCGAGGAGACTGTCAGACTTGGGACCGGGA  
GAGGCTAGAGGTACTTCTGGGGTAGGGGTAAATCCTGTAATCCTAGAAGGACCACCGGTGGCGAAGGCG  
TCTAGCTAGAACGGATCCGACGGTGAGGGACGAAGCCCTGGGGCGCAAACGGGATTAGATACCCGGGTAG  
TCCAGGGTGTAACGCTGCAGACTTGGTGTTGGAAATCCTTCGAGGGTATTCAGTGCCGGAGAGAAGTTG  
TTAAGTCTGCTACTTGGGGAGTACGTCCGCAAGGATGAAACTtAAAGGAATtGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3309-B31 [EF680370]**

TGACTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATACCTTCGGGAACTGAGGATAATACCTATAGGTTACCGATGCTGGAATGCTCGGT  
AACTCAAAGTTCGGGCGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGGAACCTCGAGTGCCTGTAC  
ATGCAGGCTGTCTGGGTGTCTAAACACACCCAAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCGGCTTAACCGTCGGGCGTCTAAGAGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTtAAAGGAATtGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3324-B32 [EF680371]**

TGACTAAGCCATGCAAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATACCCCTCGGGAACTGAGGATAATACCCATAGGTTACCGATGCTGGAATGCTCGGT  
AACTCAAAGTTCGGGCGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTGCCTGTAC  
ATGCAGGCTGTCTGGGTGTCTAAAACACACCCAAAGAAAGGACCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCGGCTTAACCGTCGGGCGTCTAAGAGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3341-A45 [EF680360]**

TGATTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGTGTAAGACCTCGGCATACTGCTCAGTAACACGTGGTTAACCTGCC  
CTAAGGTGGAGAATACTCCCGGGAACTGGGGCTAATGCTCCATAGTGGAATATCTCTGGAATGGTATAT  
CCTCGAAAGATCCGTCGCCTTAGGATGGGACTGCGTCCGATTAGGTGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCA  
AGCCTTTTATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGATCCCGGAGATGGATTCTGAGACATGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGAGCAATCGTGATAAGGAAACCTGAGTGCCTGTCTG  
ATGCAGGCTGTTTCATATATCTAAATCATATGTGAAGAAAGGGCAGGGCAAGACCGGTGCCGGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCTGCTCGAGTGATGGCCACTATTACTGGGTTTAAAGCGTCCGTAGCTTGACTGTTAGGTC  
TCTTGGGAAATCTTCGCGCTCAACGTGAAGGCGTCTAAGAGATAACCGGCAGTCTTGGAACCTGGGAGAGGT  
AAACCGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACGACCTATGGCGAAGGCAGTTTA  
CCAGAACAGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACAATGTGCGTTAGGTGTGTCGGTAACCACGTGTTACTGATGCGCCGAAGAGAAATCGTGAAA  
CGCACACCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3358-A47 [EF680361]**

TGACTAAGCCATGCGAGTCGAGAGGGTTTCGGCCCTCGGCGTACTGCTCAGTAACACGTGGATAACCTGCC  
CTAAGGAAGGGGATACCCCTCGGGAACTGAGGATAATACCCATAGGTTACCGATGCTGGAATGCTCGGT  
AACTCAAAGTTCGGGCGCCTTAGGATGGATCTGCGGCCGATTAGGTAGTTGTTGGGGTAACGGCCCAACA  
AGCCCGTAATCGGTACGGGTTGTGGGAGCAAGAGCCCCGAGTTGGATTCTGAGACACGAATCCAGGCCCT  
ACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAAACCTTTACAATGCGGGCAACCGTGATAAGGGAACCTCGAGTGCCTGTAC  
ATGCAGGCTGTCTGGGTGTCTAAAACACACCCAAAGAAAGGGCCGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGCCGCG  
GTAATACCGGCGGCTCGAGTGGTGGCCACTTTTATTGGGCTTAAAGCGTTTCGTAGCTGGGTTGTTAAGTC  
TCTTGGGAAATCCGGCGGCCTAACCGTCGGGCGTCTAAGAGATACTGGCAATCTTGGAACCGGGAGAGGT  
GAGGGGTACTTCGGGGGTAGGAGTGAAATCCTGTAATCCTCGAGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGCCTCA  
CCAGAACGGCTTCGACAGTGAGGGACGAAAGCTGGGGGAGCAAACCGGATTAGATACCCGGGTAGTCCCA  
GCCGTAAACGATGTGCGTTAGGTGTATCGACGACCACGAGTCGTGAGGTGCCGAAGGGAACCGTGAAA  
CGTACCGCCTGGGAAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**>ATB-KM-3360-A48 [EF680362]**

CGATTAAGCCATGCGAGTCAAGGTGTCTTCGGACGCCGGCGTACGGCTCAGTAACACGTAGGTAACCTAC  
CCTCAGGACTGAGATAACCCCGGGAACTGGGGCTAATATTAGATAGATAAAAAGTACTGGAATGTTCTT  
TTATCCAAAGCTTTTTCGCCTGAGGATGGGCCTGCGTCCGATTAGGTGTTGGTGGGGTAATGGCCACC  
AAGCCTGCGATCGGTACGGGCAGTGAGAGCTGAAGCCCGGAGTTGGGGACTGAGACAAGCCCCAGGCC  
TACGGGGCGCAGCAGGCGCGAAACCTCTGCAATGCGGGAAACCGTGACAGGGGGATCCCAAGTGCTCATG  
CATTGCATGGGCTGTTCTTTGGTCTAAGTAACCAGAGGAGTAAGGGCTGGGCAAGACCGGTGCCAGCCGC  
CGCGGTAATACCGGCAGCTCAAGTGGTAGCCGCGATTATTGGGCCTAAAGCGTTTCGTAGCCGGATAAGTA  
AGTCTTTTGGTTAAATCCTACAACCTCAACTGTGGGAAATCTAGGGATACTACTTGTCTTGAGACCGGGAGA  
GGTTAGAGGTACTCCTAGGGTAGGGGTGAAATCCTGTAATCCTAGGGGGACCACCTGTGGCGAAGGCGTC  
TAAGTGAACGGGTCTGACGGTGAGGGACGAAACCTAGGGGAGCGAGCCGATTAGATACCCGGGTAGTC  
CTAGGCGTAAATGATGCGAGTTAAGTGTGGGGACATCTACGAGATGGCCCTGTGCTGTAGGGTAGCCGTT  
AAACTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTTAAAGGAATTGGCGGGGGAGCA

**16S rDNA Nukleotidsequenzen (Bacteria)****>ATB-KS-0911 [EF686897]**

GAAGTAGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGATGAAAGAGAAGTGGC  
GGTCTTCGGACCAAAACATTTCTGGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGAGCAACCTGCCTATCA  
CATCGGGATAGCCTCGGGAAACTGGGATTAATACCGAATGAAAACATATTGGTAACCTTATCGAAATGTCA  
AAGATTTATCGGTGATAGATGGGCTCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAAAGCCCAACGAAGGCAA  
TGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGGAACCTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGAA  
TTCGTTTCGTAAAGCTCTGTCTATGGGAAGATAATGACGGTACCATAGAAGAAGGCCCCGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTTCGTAG  
GCGGTAATACATGTCAGATGTGAAATCTTGTGGCTTAACCACATCAAGCATCTGAAACTGTATAACTTGA  
GTGGAGGAGAGGTAAGTGAATTCTAGTGTAGC

**>ATB-KS-0912 [EF686898]**

AGAGTCTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGCGATAAG  
AGCTGATTCTTCGGATGAAGCACTTATCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAACCTGCCT  
TCTTCTGGGGGATAGCAATCGGAAACGATTGATAATACCGCATAAGACCACGAAGCCGCATGGCTTTGAG  
GTAAAAGATTTATCGGAAGAAGATGGACCCGCGTATGATTAGCCGGTTGGCGGGGTAAACGGCCCAACAAA  
GCAACGATCATTAGCCGGCCTGAGAGGGCGGACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGAGGAAAACCTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAA  
GTATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAGGCCCCCTTGCGGGGAGATGACGGTACCTGA  
GTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATTT  
ACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGAATGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCATCCCCGGGACT  
GCATTGGAAGCTGTCAATCTGGAGTGTGCGAAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTA  
GATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACGATAACTGACGTTGGAGG

**>ATB-KS-0913 [EF686899]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGCGAGCACAT  
GAAGTAGCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACCTACCTACAACAGG  
GGAATAACTCGTTGAAAGACGGACTAATACCCCATATAACAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGTTAAAG  
ATTTATCGGTTGTAGATGGGCATGCGTTCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGAT  
TGGATAGGGGAACAGAGAGGTTTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAAGCTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTGAGGAATATTGGCCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCACGTGCGGTGAAGGAAGACGGCCCTA  
CGGGTTGTAAACTTCTTTTGTAAAGGAATAAAGTGAGCCACGTGTGGTTTTTTTGCATGTACCTTACGAAT  
AAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATGCGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGG  
GTTTAAAGGGTGCGCAGGCGGGGGATTAAGTCGGCGGTGAAATTTTGCAGCTCAACTGTAAAAGTGCCTT  
CGAAACTGGTTTCCTTGAGTGTAGATGAAGTAAGCGGAC

**>ATB-KS-0914-M5 [EF686900]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGTGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACATGCAAGTTGAGGGGCGAGCACATG  
AAGTAGCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGATGCAACCTACCTACAACAGGGG  
AATAACTCGTTGAAAGACGGACTAATACCCCATATAACAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGTTAAAGAT  
TTATCGGTTGTAGATGGGCATGCGTTCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATG  
GATAGGGGAACAGAGGTTTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAAGCTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCACGTGCGGTGAAGGAAGACGGCCCTACG  
GGTTGTAAACTTCTTTTGTAAAGGAATAAAGTGAGCCACGTGTGGTTTTTTTGCATGTACCTTACGAATAA  
GGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGT  
TTAAAGGGTGCGCAGGCGGGGGATTAAGTCGGCGGTGAAATTTTGCAGCTCAACTGTAAAGTGCCTTCGA  
AACTGGTTTTCTTGAGTGTAGATGAAGTAGGCGGAATTTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCAC  
GAGGAACCTCCGATTGCGCAGGCAGCTTACTAAACTACTACTGACGCTCAGGCAC



**>ATB-KS-0915 [EF686901]**

AGAGTTTGCCTGGCTCAGATGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGAA  
GAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAATAGTGGGGG  
ATAACTTGCCGAAAGGTAAGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAAAAGGAGGGGACTCTTCGGAGCCTT  
TCGCTATTAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACCGCGATCCGT  
AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCTGGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTAGGATT  
GTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGAGCAGTTAACTAATATTTGACTGTTTTGACGTTACCGACAGAAT  
AAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTAGGAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGAATTGCTTCT  
AAAAGTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTTGGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAG  
GAAGGAACATCAGTG

**>ATB-KS-0922 [EF686902]**

AGAGTTTGCATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTGGAACGCATGATTGAT  
ACCGTAGCTTGCTACACCATTAATCATGAGTCGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTACTA  
GCGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTTTTTAACACATGTTAGAAATTTAAA  
AGGAGCAAATGCTTCACTAGTAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAA  
GGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGGAACCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAAGAGAAGAACGTTGAGTAGAGTGGAAGTTACTCAAGTGAC  
GGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCAGCGGTTG  
TCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTCTGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAAC  
CAATGTTTCGCTTTGGAACTGCAGGGCTTGAGTGCAAGAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTGAC

**>ATB-KS-0923 [EF686903]**

AGAGTTTGCATGCTGGCTCAGGAGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGAAGCACTGAA  
GAAGATTTCTTCGGAATGATTTTTTCAGTGACTGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAACCTGCC  
TCATACCGGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCGCATAGCGCACAGTACCGCATGGTACGGTG  
TGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCCGTTGGATTAGCCAGTTGGCGGGGTAACGGCCACCAAAG  
CGACGATCCATAGCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTGCGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGGAACCTCTGATGCAGCGACGCGCTGAGTGAAGAAGTA  
TTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAGACGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTA  
CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTAG  
ACGGCGGTGCAAGTCTGAAGTGAAAGGCGGGGGCTCAACTCCCCGGGTTGCTTTGGAAAGCATGGCTAGAG  
TACCGGAGGGGTAAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGGTAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCG  
AAGGCGGCTTACTGGACGGCAACTGAGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA

**>ATB-KS-0925 [EF686904]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGACGCTTT  
TGATAGACCCTTCGGGGGAAATCGGGAGCAGACAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTACC  
TATCGGAGCGGGATAGCCTCGAGAAATCGGGAGTAAAACCGCATAACACAATAGCGTCGCATGACGGAAT  
TGTCAAAACCTCCGGTGCCGATAGATGGGCCCGCGTCTGATTAGCTGGTTGGTAGGGTAACGGCCACCAA  
GGCAACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGGCGAACGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCTGACGCAGCAATACCGCGTGAGTGAAGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTGGGGAAGAAGCAGTGACGGTACCCAATGAGGAAGTCCCGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGG  
CGCGTAGGCGGTTTTATAAGTCAGATGTGAAAGGTACCGGCTCAACCGGTGACGTGCATTTGAAACTGTA  
AGACTTGAGTACTGAAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAAC  
ACCGGTGGC

**>ATB-KS-0926 [EF686905]**

TGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCAAATACTGACGCTGAGGTACGA  
AAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAACGATGTCTACTAGCCGTTGGG  
GCCTTTGAGGCTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTAA  
AACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCTGGTCTTGCCATAGTAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAATCTACATACAGG  
TGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTTT  
CCTTATTTGCCATCGGGTTAAGCCGGGAACCTTTAAGGATACTGCCAGTGACAACTGAGGAAGGCGGGGA  
CGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGTACAATGGTCGGTACAAAGGGTTGC  
TACTCCGCGAGGAGATGCTAATCTCAAAAAGCCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCAT  
GAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGAATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACC  
GCCCCGTACACCATGGGAATTTGTTGCACCAGAAGTGGGTAGTCTAACCGTAAGGAGGACGCTCACCACG  
GTGTGGCCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGTA

**>ATB-KS-0928 [EF686906]**

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCACGG  
GTAGCAATACCTGGTGGCGACCGGCGGAAGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACATGCCCATACAGGGGAATA  
AACCAGGGAAACTTGGTCTAATGCCCCATAGCAATAAGATAAGGCATCTTATTTTATTTAAAGCTTCGGT  
GGTATAGGATTGGCTCGCGTGACATTAGCTGGATGGTGGGGTAACGCGCCACCATGGCGATGATGTCTAG  
GGGTTCTGAGAGGAAGACCCCCACACTGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGAGTGA  
GGAATATTGGACAATGGATGGAAATCTGATCCAGCCATGCCCGGTGCAGGAAGACGGCCCTATGGGTTGT  
AAACTGCTTTTCTACCGGAGCAATAAGGTCTACGCGTAGACTGATGAGAGTACCGTAGGAATAAGCATCG  
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTTGGGTTTAAAG  
GGTGCGTAGGCGGCTTTTAAAGTCAGCGGTGAAATTTTGAGCTTAACTGTAACAGTGCCGTTGATACTG  
GGGAGCTAGGATTTGGTTGCTGTGGGTGGAATGTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGAGATCACACAGA  
ATATCGATTGCGAAGGCAGCTCACAAAGCCAAGATTGACGCTGAGGCACGAAAGTGTG

**>ATB-KS-0929 [EF686907]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGCGATAAG  
AGCTGATTTTTCGGATGAAGCACTTATCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAACTGCCTTC  
TTCTGGGGGATAGCAATCGGAAACGATTGATAATACCGCATAAGACCAGAAGCCGCATGGCTTTGAGGCA  
AAAGATTTTATCGGAAGAAGATGGACCCGCGTATGATTAGCCGTTGGCGGGGTAACGCGCCACCAAAGCA  
ACGATCATTAGCCGGCCTGAGAGGGCGGACGGCCACATTGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCGCGGTGAGTGAAGAAGTA  
TTTCTTTTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAGGCCCCCCCTTGCGGGGAGATGACGGTACCTGAGTA  
AGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATTTACT  
GGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGAATGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGGCTCATCCCCGGGACTGCA  
TTGGAAACTGTCAATCTGGAGTGTGCGGAAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAT  
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAATACTAGGTG

**>ATB-KS-0934 [EF686908]**

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGGGCCTAATACATGCAAGTGGAACGCATGATTGA  
TACCGTAGCTTGCTACACCTAATCATGAGTCGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTACTAG  
CGGGGGATAACTATTGGAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTTTTTAACACATGTTAGAAATTTAAAA  
GGAGCAAATGCTTCACTAGTAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAG  
GCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGCGCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGGAACCCTGACCGAGCAACGCGCGGTGAGTGAAGAA  
GGTTTTTCGTATCCCCCCCCCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGTTAAAAAAGTAAAGAGTTACTCAAGTGACG  
GTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTTCCCGAGCGTTGT  
CCGGATTTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTCTGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAACC  
AATGTTGCTTTTGAAACTGCAGGG

**>ATB-KS-0936 [EF686909]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGAAACGGGC  
ATTCAGCTTGCTGAATGTTGTGTCGTCGACCGGCGAATGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTACCCTTCAGT  
AGGGAATAGCCTTGCGAAAGTAAGATTAATGCCCTATGTATTTTCCGATCCCATGAGAAGAGAAATAAA  
GATTTATCGCTGAAGGATGGGGATGCGTCTGATTAGGCAGTTGGCGGGGTAACGGCCCCACAAACCGACG  
ATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACATTGGAAGTGAACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGAAGACGGCCCT  
ATGGGTGTTTCTGCTTTTGTGCGGGGATAAAGTGAGTCACGCGTGACTTATTGCAGGTACCGCGCGAAT  
AAGGACCGGCTAATTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATTTATTGG  
GTTTAAAGGGAGCGTAGGCCGAGATTAAGTGTGTTGTGAAATGCGGGGGCTCAACCTCTGGATTGCAGC  
GCATACTGGTTTTCTTGAGTACGCGCAACGTTGGCGGAATTTGTCTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATAT  
GACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCTGACGGGAGCGCAACTGACGCTGAAGCTCGAAAGTGCGGGTA  
TCGAACAGGATTAGATA

**>ATB-KS-0939 [EF686910]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGCGAACGGG  
ACTTCGGTTCCTAGTAGAGTGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTAGATAACCTATCTTTATGTCTGGGATAA  
CACGCCGAAAGGGGTACTAATACCGGATATTCTTGCAATTCATAAGTATTGCAAGGAAAGGTGGCCTCTG  
ATTCAGCTACTGCATAGAGAGGGGTCTGCGTACCATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCCTACCTAGGC  
AACGATGGTTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGCACTGAAACACGGGTGAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGAGGAATATTGCGCAACGGGGGCAACCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAGGAAGG  
CCTTCGGGTCTTTTAGCTCTCTCAAGAGGGAAGAAGTGTCATGGTAACTAAAACGGGGCATGTTTGACGGT  
ACCTCTAAAGGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTGTTT  
GGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGCCTGCCAAGTCAGATGTGAAATGCCATGGCTTAACCAT  
GGACGTGCATTTGAAACTGGTGGGCTTGAGTACCAGAGGGGAAGGTGGAATTTCCGGTGTAGAGGTGAAA  
TTCGTAGATATCGGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGCTGGATACTGACGCTGAGGCGCG

**>ATB-KS-0940 [EF686911]**

AGAGCTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGCGATAA  
GAGCTGATTCTTCGGATGAAGCACTTATCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAACCTGCC  
TTCTTCTGGGGGATAGCAATCGGAAACGATTGATAATACCGCATAAGACCACGAAGCCGCATGGCTTTGA  
GGTAAAAGATTTATCGGAAGAAGATGGACCCGCGTATGATTAGCCGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAA  
AGCAACGATCATTAGCCGGCCTGAGAGGGCGGACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGAGGAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGA  
AGTATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAGGCCCCCCCTTGCGGGGAGATGACGGTACCTG  
AGTAAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAACAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATT  
TACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGAATGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGGGCTCATCCCCCGGG  
ACTGCATTGGAAACTGTCAATCTGGGAGTGTGCGAAGGGCCAAGCGGAATTCCTGGTGTAAACCGGTTGAA  
ATGCCGTAGATTATCAAGGAGGAAACACCC

**>ATB-KS-0941 [EF686912]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCATCGCGG  
TTCCGGCAACGGGACCGGCGGCGACCGGCATACGGGTGCGTAACGCGTGAGCGACATTCCCGGGACCGGG  
GTATAACCGACGGAAACGTCGCCTAATCCCCGTAACACCATCGGGCGCATGCCCTTTGGTTGAAAGCTC  
CGGCGGTCCCGGATTGGCTCGCGTCCCATTAGGCGGATGGCGGGGTAACGGCCCACCGTACCTACGATGG  
GTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAACACGCTCCATACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGACGACGGCCCTACGG  
GTTGTAAACCGCTTTTGCAGGGGAGCAATAAGGGGGTTTTCGTACCCCCGACGAGCGTACCTTGCGAATCA  
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGT  
TTAAAGGGTGCGTAGGCTGTGCGTCAAGTCAGGGGTGAAATTCCTGCGTCAACGTCGGGTGTGCCCTTG  
ATACTGGCGTGCTGGAGTACGGATGCCGCCGAGGAATGAGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCA  
CTCAGAACACCGATTGCGAAGGCATCTGGGCGAATCCGTCACTGACGCTGATGCACG

**>ATB-KS-0943 [EF686913]**

AGAGCTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGACGCTTT  
TGATAGACCCTTCGGGGGAAATCGGGAGCAGACAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTACC  
TATCGGAGCGGGATAGCCTCGAGAAATCGGGAGTAAAACCGCATAACACAATAGCGTCGCATGACGGAAT  
TGTCAAAACCTCCGGTGCCGATAGATGGGCCCCGCTCTGATTAGCTGGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAA  
GGCAACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGGCGAACGGCCACACTGGAAGTGAACACGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCCTGACGCAGCAATACCGCGTGAGTGAAGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTGGGGAAGAAGCAGTGACGGTACCCCAATGAGGAAGTCCCGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGACGAGCGTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGC  
GCGTAGGCGGTTTTATAAGTCAGATGTGAAAGGTACCGGCTCAACCGGTGACGTGCATTTGAAACTGTAA  
GACTTGAGTACTGAAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACA  
CCGGTGGCGAAAGCGGCTTGCTGGGCAGATACTGACACTGAGGTGCG

**>ATB-KS-0946 [EF686914]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGCTTCTTAAGCATGCAAGTCGGGCGGCAGCCGCA  
GCGATGCGGCGAGAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGACAACCGACCTCCGGACGGGGATAGCCGC  
GGGAAACTGCGGATAATACCGGATACGACCCGGGGAGCGAAGGCGCTCCGGGGGAAAGCCGCTGCGGCGG  
CGCCGGGGGACGGGTCTGCGTCCCATCAGCTAGACGGCGGGGTGAAGGCCACCGTGGCGACGACGGGTA  
GCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACATTGGGACTGAGAACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGCT  
AAGGATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGACGATGGAGGCCGTGAGGTTGT  
AAAGTCCTTTTTTTTTTCCCGTGACAGCCGTGCCAGGGAATGGGTGCAAAAGGACATGGCCACGGGAATAA  
GCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCGAGCGTTGTTCCGGAATCATTGGGC  
GTAAAGGGCGCGCAGGCGGCTGCGGGAGCCCGGCGTGAAATCCACAGGCCCAACCTGTGGGGGTCGCCGG  
GGACTCCGCGGCTGGAGTCCAGGAAGCGGTTCCAGGAATTCCTGGTGTAGGGGTGAAATCTGTAGATATCG  
GGAAGAACACCAATGGCG

**>ATB-KS-0949 [EF686915]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGGTGCCTAACACATGCAAGTCGAATGAGCGATAA  
GAGTTGATTCTTCGATGAAGCGCTTATCTGCGAGTGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAACCTGCCT  
TCTTCTGGGGGATAGCAATCGGAAACGATTGATAATACCGCATAAGACCACGAAGCCGCATGGCTTTGAG  
GTAAAAGATTTATCGGAAGAAGATGGACCCGCGTATGATTAGCCGGTTGGCGGGGTAAACGGCCCACCAA  
GCAACGATCATTAGCCGGCCTGAGAGGGCGGACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGAGGAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAA  
GTATTTTCGGTTTGTAACCTCTATCAGCAGGGAAGAAAGCCCCCTTGAGGGGAGATGACGGTACCTGAGT  
AAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATTTAC  
TGGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGAATGGCAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGGGCTCATCCCCGGGACTGC  
ATTGGAACCTGTCAATCTGGAGTGTGCGAAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
TATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGA

**>ATB-KS-0952 [EF686916]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGT  
CCAGCAATGGATGATGGCGACCGGCGGAAGGGTGCCTAACGCGTGAGCAACATGCCCTATACAGGGAGAT  
ACACCAGGGAAACTTGGCCTAATATCCCATAGCATTCAATTGAAGGCATCTTTAATGAATTAAAGCTTCGG  
TGGTATGGATTGGCTCGCGTGACATTAGCCAGATGGTGAGGTAAACGGCTCACCATAGCAATGATGTCTAG  
GGGTTTTTGAGAGGAAGGCCCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
AGGAATATTGGACAATGGATGGAAATCTGATCCAGCCATGCCGCGTGACGGAAGACGGCCTTATGGGTTG  
TAAACTGTTTTTATCCCCCGCAATAAGGGTTACGAGTAATCCGATAAAAGAGGGGGGAATAAGGATCG  
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGTTTAAAG  
GGTGCGTAGGCGGCCATTTAAGTCAGCGGTGAAATTTTGACGCTTAACTGTAACAGTGCCGTTGATACTG  
TTTGGCTAGGATTTGGTTGTAGTGTGCGGAATGTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACACAGA  
ACACCGATTGCGAAGGCAGCACACTAAGTCATTATTGACGCTGAGGCACGAAAGTGTGGGGATCAAACG  
GATTAGATACCCTGGT

**>ATB-KS-0959 [EF686917]**

AGAGTTTGTATMTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGACTAAGAC  
CGACACCGGAGATTTCAGTTGGCCGGCGGGGACACGGGCCGGGTGAATGGCCGGTGTGGGCTTAGTTTCAG  
TGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCTGCCTTTCAGAGCGGGATAGCGTCTGGAACGGGCGGT  
ATACCGCATGACATTCCGGAGCCGCATGGTTCTGGAATCAAAGGAGCAATCCGCTGGAAGATGGACTCAC  
GTCCGATTAGCCGGTTGGCGGGGTAATGGCCACCAAAGCAACGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAA  
CGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGG  
AGGAAACTTTGATGCCCCACGCCGCTGAGGGAAGACGGTCTTCAAATTGGGGACCTATGTCTTCGGTG  
ACGATAATGACGGTAGCCGAGGAGGAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGG  
AGCGAGCGCTGTCCGATTCTACTGGGTGTAAAGGGTGCCTAGGCGGCTTTTAAAGTCAGGTGTGAAAACC  
GTGGGCTTAACTCACGGATTGCATTTGAACTGAGGGGCTTGAGTGAGCAGAGGCAGGCGGAATTCCCCG  
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCCTGCTGGGCTTTAACTG  
ACGCTGAG

**>ATB-KS-0963 [EF686918]**

AGAGTTTCATCCTGGCTCAGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGAATTTAT  
TTCGGTAAATTCTTAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCCTCCAGTTGGGGACAACAT  
TCCGAAAGGATGCTAATACCGAATGTGATCCCTTTTCGCGATGGAGAAGGGATGAAAGATGGCCTCTATT  
TATAATATCGCTGGAAGATGGGCCTGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGAT  
GATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGGCCAAACTCCTACGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTCTT  
CTGATTGTAAAACTCTGTTGTGTCAGGGACGAATGTGCGAACGTTGAATAAGCGTTTGTATTGACGGTACCT  
GACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAA  
TTATTGGGCGTAAAGAGCATGTAGGCGGGCTTTTAAAGTCCGACGTGAAAATGCGGGGCTTAACCCCGTAT  
GGCGTTGGATACTGGAAGTCTTGAGTGACAGGAGAGGAAAGGGGAATTCCAGTGATGCGGTGAAACGCGT  
AGATATTGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATGCG

**>ATB-KS-0965 [EF686919]**

AGAGTTTGTATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCATCGCGG  
TTCCGGCACGGGACCGGCGGCGACCGGCATACGGGTGCGTAACGCGTGAGCGACATTCCCGGGACCGGGG  
TATAACCGACGGAAACGTCGCCTAATCCCCCGTAACACCATCGGGCGCATGCCCTTTGGTTGAAAGCTCC  
GGCGGCCCCGATTGGCTCGCGTCCCATTAGGCGGATGGCGGGGTAAACGGCCACCATACTACGATGGGT  
AGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAACACGCTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGACGACGGCCCTACGGGT  
TGTAATAATTTTTTTTGCAGGGGAGCAATAAGGGGGTTTTCGTACCCCCAAAGAGGGGTACCTTGCGAATCAGC  
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTT  
AAAGGGTGCGTAGGCTGTGCGTCAAGTCAGGGGTGAAATTCCGTGCGTCAACGTCGGGTGTGCCCTTGAT  
ACTGGCGTGCTGGAGTACGGATGCCGCCGAGGAATGAGTGGCGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCACT  
CAGAACACCGATTGCGAAGGCATCTGGCGAATCCGTCACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATAAA  
ACAGGATTAGATAC

**>ATB-KS-0966 [EF686920]**

AGAGTTTGTATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGACGCTTT  
TGATAGACCCTTCGGGGGAAATCGGGAGCAGACAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTACT  
TATCGGAGCGGGATAGCCTCGAGAAATCGGGAGTAAAACCGCATAACACAATAGCGTCGCATGACGGAAT  
TGTCAAAACCTCCGGTGCCGATAGATGGGCCCGCGTCTGATTAGCTGGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAA  
GGCAACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGGCGAACGGCCACACTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCCCTGACGCAGCAATACCGCGTGAGTGAAGA  
AGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTGGGGAAGAAGCAGTGACGGTACCCAGTGAGGAAGTCCCGGC  
TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGG  
CGCGTAGGCGGTTTTATAAGTCAGATGTGAAAGGTACCGGCTCAACCGGTGACGTGCATTTGAAACTGTA  
AGACTTGAGTACTGAAGAGGCAAGCGGAATTCTAGTGATGACGGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAAC  
ACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCAGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGA  
TTAGATA

**>ATB-KS-0968 [EF686921]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGAGCACTT  
GTGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTAGACAGGGGGATAACTATTGGAAA  
CGATAGCTAAGACCGCATAGGTACGGACACTGCATGGTGACCGTATTAAGAGTGCCTCAAAGCACTGGTA  
GAGGATGGACTTATGGCGCATTAGCTGGTTGGCGGGGTAAACGGCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGA  
CCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGA  
ATTTTCGGCAATGGGGGAAACCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAAC  
TTCTGTTATTTTGAAGAAGGCGGTACAGGAAATGGTAGCCGAAAAGAAAGGCGTTATTAGAAAAGCCAC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAA  
GAGGGAGCAGGCGGCAGCAAGGGTCTGTGGTGAAAGCCTGAAGCTTAACCTCAGTAAGCCATAGAAAACCA  
GGCAGCTAGAGTGCAGGAGAGGATCGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGA  
ACACAGTGGCGAAGGCGACGATCTGGCCTGCAACTGACGCTCAGTCCCAGAAAGCGTGGGGAGCAAAATAG  
GATTAGATA

**>ATB-KS-0970 [EF686922]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGAATAGGT  
AGCTTGCTACCGATTTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAA  
CATTTTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCT  
AATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGG  
GTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGG  
AATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTTTGGTTGTAAA  
GCACTTTAATCTAGGACCACGCTACTTTAGTTAATACCTAGAGATAATGGAGGGGGCTCGCAGAATAAGC  
ACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGT  
AAAGCGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCGGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATTTCGAT  
ACTGGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG  
AGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCCTAATACTGACGCTGAGGCACGAAAGCATG

**>ATB-KS-0978 [EF686923]**

AGAGTTTGCATCMTGGCTCAGCAAGTCGAGCGGGGAAGGTTGCTTCGGTAACTAACCTAGCGGCGGACGGG  
TGAGTAATGCTTAGGAATCTGCCTATTAGTGGGGGACAACATTCGAAAGGAATGCTAATACCGCATACG  
TCCTACGGGAGAAAAGCAGGGGATCATTTGACCTTGCGCTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTAGCTAGTT  
GGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCTGAGAGGATGATCCGCCACACTGGGACT  
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCA  
GCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCCTTTTGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGAGGAGGAGGCTCTCTTGGT  
TAATACCTGAGAAGAGTGGACGTTACTCGCAAAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATACAGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGCTAATTAAGTCAAA  
TGTGAAATCCCCGAGCTTAACCTTGGGAATTGCATTTCGATACTGGTTGGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGT  
AGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGG  
CCTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCATGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCG  
TAAACGATGTCTACTAGC

**>ATB-KS-0981 [EF686924]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTGGAACGCATGATTGA  
TACCGTAGCTTGCTACACCATTAATCATGAGTCGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCCTACT  
AGCGGGGGATAACTATTGGAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTTTTTAACACATGTTAGAAATTTAA  
AAGGAGCAAATGCTTCACTAGTAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA  
AGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGGGGGAACCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG  
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAGAGAAGAACGTTGAGTAGAGTGGAAGTTACTCAAGTGA  
CGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTT  
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGCTCTGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAA  
CCAATGTTTCGCTTTGGAACTGCAGGGCTTGAGTGCAGAAGGGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCT  
CGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCAGGTGT  
TAGG

**>ATB-KS-0983 [EF686925]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTCAATACATGCAAGTCGAGCGAGGTTACTG  
CGACAGATCCCTTCGGGGTGAAGTTGCTTTAGCCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTA  
CCCTAAAGTTTCGGGATAACAGCGGGAAACCGCTGCTAATACCGGATAACCTTTACCGTGTGGCATCACAGG  
GTAAAGAAAGGTAACGCTTTAGGATGGGCCCCGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACAGCTCACCAA  
GGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCGCAATGGACGGAAGTCTGGCGCAGCGACGCCGCGTGAGCGATGA  
AGGCCTTCGGGTGCTAAAGCTCTGTCTTGGGGAAGAAGTTTTTCGGACTTGACGGTACCCAAGAAGAAA  
GCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGC  
GTAAAGGGTGCCTAGGCGGCCCTTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGCAGCTTAACTGCGGAATTGCATTTG  
AAACTGGAGGGCTTGAGTGTGCGAGAGGGTAGTGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTG  
GGGATGAACACCATATGGCGAA

**>ATB-KS-0984 [EF686926]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGCGAGCACAT  
GAAGTAGCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACCTACCTACAACAGG  
GGAATAACTCGTTGAAAGACGGACTAATACCCCATATAACAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGTTAAAG  
ATTTATCGGTTGTAGATGGGCATGCGTTCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA  
TGGATAGGGGAAGTGAAGGTTTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCACGTGCGGTGAAGGAAGACGGCCCTA  
CGGGTTGTAAACTTCTTTTGTAAAGGGAATAAAGTGAGCCACGTGTGGCTTTTTTGCATGTACCTTACGAAT  
AAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGG  
GTTTAAAGGGTGCAGGCGGGGAGATTAAAGTCGGCGGTGAAATTTTGCAGCTCAACTGTAAAGTGCCCTT  
CGAACTGGTTTCTTGTAGTGTAGATGAAGTAGGCGGAATTTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATAT  
CACGAGGAAGTCCGATTGCGCAGGCAGCTTACTAACTACTACTGACGCTCAGGCACGAAGGCGTGGGGA  
TCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGGTTACTAGCTGTTTGCATACAATGT  
AAGCGGCTGAGCGAAAGC

**>ATB-KS-0989 [EF686927]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCGAGCGCGG  
TGCGAGCAATGTACTGGCGGCGACCGGCGAAAGGGTGCGCAACGCGTGAGCGACATGCCCGTCACAGGGG  
GATAATCGGCGGAAACGCCGTCTAATATCCCATAACACCGCCATCTGCATGGATGGAGGTTGAAAGCCAC  
GGCGGTGACGGATTGGCTCGCGTCCGATTAGCCAGTTGGCGGGGCAACGGCCCACCAAAGCAGCGATCGG  
TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAACGAGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGACGGAATGAGGCCCTATGGG  
TTGTAAACTGCTTTTCCCGCGGAGCAATAAGGATGTTTCGTACATCCGATGAGAGTACGCGGGGAATAAG  
CATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTCAATTGGGTA  
TAAGGGTGCCTAGGCGGCCGAGCATGTGAGCTGGTGAAATGTCCGGGGCCCAACCCGGGAAGGTGCCGTTG  
ATACTGTTTTTGGTGGAGTACGGACGCCGCGGAGGAATGAGTGTGTACCGGTGAAATGCATAGATATT  
CATTCA

**>ATB-KS-0994 [EF686928]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGTGATAAG  
AGCTGATTCTTCGGATGAAGCACTTATCTGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGAACCTGCCT  
TCTTCTGGGGGATAGCAATCGGAAACGATTGATAATACCGCATAAGACCACGAAGCCGCATGCTTTGAGG  
TAAAGATTTATCGGAAGAAGATGGACCCGCGTATGATTAGCCGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAAG  
CAACGATCATTAGCCGGCCTGAGAGGGCGGACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACG  
GGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAG  
TATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAGGCCCCCTTGTGGGGAGATGACGGTACCTGAGT  
AAGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTATCCGGATTTAC  
TGGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGAATGGCAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGGGCTCATCCCCGGGACTGC  
ATTGGAAGTGTCAATCTGGAGTGTGGAAGGGCAAGCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAT  
ATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACGATAACTGACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGG  
GAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAATACTAGGTGTT

**>ATB-KS-0995 [EF686929]**

AGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGT  
CCAGCAATGGATGATGGCGACCGGCGGAAGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACATGCCCTATACAGGGAGAT  
ACACCAGGGAACTTGGTCTAATATCCCGTAGCATTCAATTGAAGGCATCTTTAATGAATTAAAGCTTCGG  
TGGTATAGGATTGGCTCGCGTGACATTAGCCAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATAGCAATGATGTCTA  
GGGGTTTTTGAGAGGAAGGCCCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GAGGAATATTGGACAATGGATGGAATCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCTTATGGGTT  
GTAAACTGCTTTTATACGGGAGCAATAAGGGTTACGAGTAATCCGATGAGAGTACTGTATGAATAAGGAT  
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGATGATCCGAGCGTTATCCGGAATTATTGGGTTTAA  
AGGGTGCGTAGGCGGCCATTTAAGTCAGCGGTGAAATTTTGAGCTTAACTGTAACAGTGCCGTTGATAC  
TGTTTGGCTAGGATTTGGTTGTAGTGTGCGGAATGTGTGGTGTAGCCGGTGAAATG

**>ATB-KS-0998 [EF686930]**

AGAGTTTGTATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGAGCACTTG  
TGCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATAAGTAACCTGCCCTAGACAGGGGGATAACTATTGGAAAC  
GATAGCTAAGACCGCATAGGTACGGACACTGCATGGTGACCGTATTAAAAGTGCCCTCAAAGCACTGGTAG  
AGGATGGACTTATGGCGCATTAGCTGGTTGGCGGGGTAACGGCCCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGAC  
CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAA  
TTTTCGGCAATGGGGGAAACCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAAGGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAACT  
TCTGTTATAAAGGAAGAACGGCGGCTACAGGAAATGGTAGCCGAGTGACGGTACTTTATTAGAAAGCCAC  
GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGGATTATTGGGCGTAAA  
GAGGGAGCAGGCGGCAGCAAGGGTCTGTGGTGAAAGCCTGAAGCTTAACTTCAGTAAGCCTAGAAACCAG  
GCAGCTAGAGTGCAGGAGAGGATCGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAA  
CACCAGTGGCGAAGGCGACGATCTGGCCTGCAACTGACGCTCAGTCCCGAAAGCGTGGGGAGCAAATAGG  
ATTAGATACCCTAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGATGTCAAAGTTCAGTGCTGC  
AGTTAACGCA

**>ATB-KS-0999 [EF686931]**

AGAGTTTGTATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCATCGCGG  
TTCCGGCAACGGGACCGGCGGCGACCGGCATACGGGTGCGTAACGCGTGAGCGACATTCCCGGGACCGGG  
GTATAACCGACGGAACGTCGCCTAATCCCCGTAAACACCATCGGGCGCATGCCCTTTGGTTGAAAGCTC  
CGGCGGTCCCGGATTGGCTCGCGTCCCATTAGGCGGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATACCTACGATGG  
GTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGACGACGGCCCTACGG  
GTTGTAAACCGCTTTTGCAGGGGAGCAATAAGGGGGTTTTCGCACCCCCGACGAGCGTACCCTGCGAATCA  
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGT  
TTAAAGGGTGCGTAGGCTGTGCGTCAAGTCAGGGGTGAAATTCCGTGCGTCAACGTCGGGTGTGCCCTTG  
ATACTGGCGTGCTGGAGTACGGATGCCGCCGGAGGAATGAGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCA  
CTCAGAACACCGATTGCGAAGGCATCTGGCGAATCCGTCACTAACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATA  
AAAACAGGGATTAGATACCCTGGTATTCCACGCCGTAAACGATGATGACTAGCCGCCGCGGACATGCTGT

**>ATB-KS-1001 [EF686932]**

AGAGTTTGTATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCATGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGCTTTTCG  
GGCATAGTGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTGGAATCTGCCCTTGGTTCGGAATAACAGTTAGAAATGA  
CTGCTAATACCGGATGATGACGTAAGTCCAAAGATTTATCGCCATGGGATGAGCCCGCGTAGGATTAGCT  
AGTTGGTGTGGTAAAGGCGCACCAAGGCGACGATCCTTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGG  
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGA  
TCCAGCAATGCCGCGTGGGTGATGAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGCTCTTTTACCCGTGATGATAATGACA  
GTAGCGGGAGAATAAGCCCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGGGCTAGCGTTGT  
TCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGCTTTGTAAAGTTAGAGGTGAAAGCCTGGAGCTCAACT  
CCAGAAGTGCCTTTAAGACTGCATCGCTTGAATCCAGGAGAGGTGAGTGGAATTCCGAGTGTAGAGGTGA  
AATTTCGTAGATATTCCGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCACTGGACTGGTATTGACGCTGAGGTGC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATAACTAGCTGTC  
CGGGGACTTGGTCTTTGGGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTAT



**>ATB-KS-1011 [EF686933]**

AGAGTTTGTATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTTGAACGGTCCGGCAT  
GGAAGCTTGCTGAAGTGTCTGGGTAGTAGCGGACGGGTGAGTAATGCATGAGAAGCTGCCATTGGGAGGGG  
GACAACAGTTGGAAACGGCTGCTAATACCCCATATGCCGAAAGGTGAAAGGGAGCGATCCGCCCGATGAG  
GTGCTCATGTCTATCAGCTGGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAG  
AGGGTGACCGGCCACACTGGAAGTGAAGTACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTG  
GGCAATGGGGGGAACCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTT  
TGTACGGGAAGAAGGACGTGACGGTACCGTACGAATAAGTCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGT  
AATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGCGGTATATCAAGTCAG  
CTGTCAAAGACTGGGGCTCAACCTGGTATGCGGTTGAAACTGATATGCTGGAGTGTCTGAGAGGCAAGT  
GGAATTCCCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGACTTGCTGG  
GCAGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCAGGGGAGCAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCTGGCCG  
TAAACGATGAATGCTAGGTGTGTGTGTAGAGATACATGCGTGCCGGAGTTAACGCGATAAGCATA

**>ATB-KS-1012 [EF686934]**

AGAGTTTGTATCATGGCTCAGGACGAACGGTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGGACTAAGA  
CCGACACCGGAGATTAGTTGGCCGGCGGGGACACGGGCCGGGTGAATGGCCGGTGTGGGCTTAGTTCA  
GTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCTGCCTTTCAGAGCGGGATAGCGTCTGGAAACGGACGGT  
AATACCGCATGACATTCCGGAGCCGCATGGTTTTGGGATCAAAGGAGCAATCCGCTGGAAGATGGACTCG  
CGTCCGATTAGCCGGTTGGCGGGGTAACGGCCCCACCAAAGCAACGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGA  
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGGATATTGCACAATG  
GAGGAAACTCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGACGGTCTTCGGATTGTAAACCTATGTCTCGGT  
GACGATAATGACGGTAGCCGAGGAGGAAGCTCCGGCTAACTACGTGCCAGCAACCGCGGTAATACGTAGG  
GAGCGAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGTGCGTAGGCGGCTTTTTAAGTCAGGTGTGAAAAC  
CGTGGGCTTAACTACGGATTGCATTTGAAACTGAGGGGCTTGAGTGGAGCAGAGGCAGGCGGAATTCCC  
GGTGTAGCGGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCCTGCTGGGCTTTAACTG  
ACGCTGAGGCACGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT

**>ATB-KS-1013 [EF686935]**

GCACTGCCTGGTGCAGAGGTCAAGGAGCAATCCGGTGGAAGATGGACTCGCGTCCGATTAGATAGTTGGT  
GGGGTAATGGCCTACCAAGTCAGCGATCGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGA  
AGACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGGGAAACCTGACCCAGCG  
ACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGTTTTTCGGATTGTAAACCTCTGTTCTTGTTGTAAGAGTGGAAAGACGGTAAC  
CAAGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAGCGTTGTCCGGA  
ATGATTGGGCGTAAAGGGCGCGTAGGCGGCTGTTTTAAGTCTGGAGTGGAAAGTCTATTTTTAAGGTAGGA  
ATTGCTTTGGAAACTGAGCAGCTTGAGTGCAGGAGAGGTCATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGC  
GTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGGTGACTGGACTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAG  
TGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGAATGCT

**>ATB-KS-1018 [EF686936]**

AGAGTTTGTATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGAGAAGGAA  
GGTGCTTGCATCTTCCGGATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTAACCTGCCCATGTACCCGGG  
ACAACGGTTGGAAACGACTGCTAAAACCGGATAGGCATATGGAAAGGCATCTTCGATATGTTAAAGGGGCC  
ACGGCCCTGGACATGGATGGACCTGCGGTGCATTAGCCAGTTGGTGAGGTAACGGCCCCACCAAGGCGACG  
ATGCATAGCCGACCTGAGAGGGCGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTAGGGAATTTTCGTCAATGGGGGGAACCTGAACGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGACGGTCTT  
CGGATTGTAAAGCTCTGTTGCGAGAGAAAAAGGACAGGAAGAGGAATGCTTCCGGTTTGATGGTATCTC  
GCCAGAAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGAAT  
GATTGGGCGTAAAGGGTACGTAGGCGGCCAGATAAGTCTGGTGTGAAAGGCTGCAGCTCAACTGCAGCAC  
TGCACTGGAAACTGTCCGGCTGGAGTGCAGAAGAGGGCGATGGAAGTCCATGTGTAGCGGTAAAATGCGT  
AGATATATGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGTGCGCTGGTCTGCAACTGACGCTGAAGTACGAAAGCG  
TGGGGAGCAAATAGGATTAGATACCCTAGTAGTCCACGCCGTAAACGAT

**>ATB-KS-1028 [EF686937]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGAGGAAAAG  
AGAAGCTTGCTTCTTTTGAATCTAGTGGCAAACGGGTGAGTAACACGTAAACAACCTGCCTTCAGGATG  
GGGACAACAGACGGAAACGACTGCTAATACCGAATGTGTTCCGGAGACCGCATGATTTCTGGAAGAAAGG  
ATGGCCTCTATTTATAAGCTATCGCCTGAAGAGGGGTTTGCCTCTGATTAGGCAGTTGGTGAGGTAACGG  
CCCACCAAACCTACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCA  
GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG  
AGTGATGACGGCCTTCGGGTGTAAAGCTCTGTGATCGGGGACGAATGGCTGGTATGCTAATACCATATC  
AGAGTGACGGTACCCGAATAGCAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGC  
AAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGCTTCTTAAGTCCATCTTAAAAGTGCGG  
GGCTTAACCCCGTGATGGGATGGAAGCTGGGAGGCTGGAGTATCGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGT  
AGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGACTTTTCTGGGACGACAACTGAC  
GCTGAGGCGCG

**>ATB-KS-1029 [EF686938]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGCGACACAT  
GAAGTAGCAATACTGATGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACCTACCTACAACAGG  
GGAATAACTCGTTGAAAGACGGACTAATACCCCATATAACAGGGATCCCGCATGGGAATATTTGTTAAAG  
ATTTATCGGTTGTAGATGGGCATGCGTTCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGA  
TGGATAGGGGAACCTGAGAGGTTTATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACAGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGCAAGTCTGAACCAGCCACGTGCGGTGAAGGAGGACGGCCCTA  
CGGGTTGTAAACTTCTTTTGTAAAGGAATAAAGTGAGCCACGTGTGGTTTTTTTGCATGTACCTTACGAAT  
AAGGATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGG  
GTTTAAAGGGTGCGCAGGCGGGGGATTAAAGTCGGCGGTGAAATTTTGCAGCTCAACTGTAAAAGTGCCCTT  
CGAAACTGGTTTCTTGTAGTGTAGATGAAGTAGGCGGAATTTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATAT  
CACGAGGAACCTCCGATTGCGCAGGCAGCTTACTAACTACTACTGACGCTCAGGCACGAAGGCGTGGGGA  
TCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGATTACTAGCTGGCCCTTTAATC

**>ATB-KS-1032 [EF686939]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTGGAACGCATGATTGA  
TACCGTAGCTTGCTACACCATTAATCATGAGTCGGAACGGGTGAGTAACGCGTAGGTAACCTGCCTACT  
AGCGGGGGATAACTATTGGAACGATAGCTAATACCGCATAAGAGTTTTTAACACATGCTAGAAATTTAA  
AAGGAGCAAATGCTTCACTAGTAGATGGACCTGCGTTGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA  
AGGCGACGATACATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCCTCGGCAATGGGGGGAACCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAG  
AAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTAAAGAGAAGAACGTTGAGTAGAGTGGAAGTTACTCAAGTGA  
CGGTATCTTACCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTCCCGAGCGTT  
GTCCGGATTTATTGGGCGTAAGGCGAGCGCAGGCGGCTCTGTAAGTCTGAAGTTAAAGGCATTGGCTCAA  
CCAATGTTTCGCTTTGGAACTGCAGGGCTTGAGTGCAAGGGGAGAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTG  
AAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTC  
GAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGC

**>ATB-KS-1035 [EF686940]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTATGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAGACGCTTT  
TGATAGACCCTTCGGGGGAAATCGGGAGCAGACAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTACC  
TATCGGAGCGGGATAGCCTCGAGAAATCGGGAGTAAAACCGCATAACACAATAGCGTCGCATGACGGAAT  
TGTCAAAACCTCCGGTGCCGATAGATGGGCCCCGCTCTGATTAGCTGTTGGTAGGGTAACGGCCTACCAAG  
GCAACGATCAGTAGCCGGTCTGAGAGGGCGAACGGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGCAACCTGACGCAGCAATACCGCGTGAGTGAAGAA  
GGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTATTGGGGAAGAAGCAGTGACGGTACCCAATGAGGAAGTCCCGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGACGAGCGTTGTCCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGC  
GCGTAGGCGGTTTTTATAAGTCAGATGTGAAAGGTACCGGCTCAACCGGTGACGTGCATTTGAAACTGTAA  
GACTTGAGTACTGAAGAGGCAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACA  
CCGGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGGCAGATACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTGGCGAATAAGTCAGT

**>ATB-KS-1037 [EF686941]**

GTTGGGCTCGGCTCAGGATGACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAGAAACCTGCAGATGACACTTCGGTAGATTACAGCAGGCGGAAAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTAGGCAACCTGCCCTTACACAGGGATAGCCTCGGGAACCGGGATTAAACCTGATGATGCATAACCATTGCATAATGGATATGCCAAAGATTTCATCGGTGAAGGATGGGCTGCGTCTGATTAGTTAGTTGGTGGGGCAACGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCAACGCCCGGTGAAGGATGAAGGCCCTTGGGTGCTAAACTTCTGTCTTAGGGAAGAAGCAAGTGACGGTACCTTTGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTGTGTTAGGTGGTTTTTTAAGCGCGGGGTTAAGGCTACGGGCTCAACTGTAGTTGCCCCGTGAAGTGGGGA

**>ATB-KS-1409 [EF686942]**

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATCATCTTTTCGGGGGTGAGAGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTAGGTTATCTACCTCAAGACGGGGACAACCAGGGAACTTTGGGCTAATACCGGATGTGAGCAACTTTTTAGTTGTTTGAAGGTGGCGTAAGCTGTCCGTTGGGGATGAGCCTGCGTCTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCAATGATAGGTAGGCGGCCTTAACGGGTGGTCGCCCACACTGGGATTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGA GAATAGTCTACAATGGTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGATGAATCCCTTCGGGGTGTAAGTTCTTTTATATGTGAGCAGTGCTTCTTATATTAAGAGTATGGGGAGAGAGATATTAGCATATGAATAAGCAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAGGCGTAAAGGGCAGGCAGGCGGATCCATAAGTTTATCGTTTAAAGGCGTCGGCTTAACGGCGTAGGGCGGTAGATACTGTGGATCTGGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGAGATCAGGAGGAATACCGAAAGCGAAGGCAGTCTTCCAAGCCGTTAATG

**>ATB-KS-1410 [EF686943]**

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTCAGACATGCAAGTCGAGCGGACGGATGCGACCCGCAAGGGGAGGCTGAAGTTAGCGGCGAACGGGTGAGTAATGCGCGGGCAATCTACCCGGAAGCCGGGGATAACGGATCGAAAGGTCCGCTAATACCGGATAATGTCTCCTGTGCGCATGATGGGGGGAAGAAAGGCCTTCGGGGCACTTTTCGGATGAGCTCGTGTCTATCAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCCAACGACGGGTAACGGTCTGAGAGGATGATCGGTACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTTAGGAATATTGGGCAATGAGCGAAAGCTTGACCCAGCGACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGCCTTTCGGGTGCTAAACCTCTGTATCGGGGACGAAGAAAGTGACGGTACCCGAGGAGGAAGCCCCTGCTAAC TACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGAGTTATTGGGCGTAAAGGGCGGTG TAGGCGGCTTGTTAAGTCAGGCGTGAAATTTTCAGGGCTCAACTCTGAAACTGCGTTTGAAACTGGCAGGCTTGAGGACAGGAGAGGGAAGTGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCA GTGGCGAAGGCGGCTTCCTGGACTGTACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCTAGGGGAGCAACAGGATTAG ATACCCTGGTAGTCTAGCTGTAAAACGATGAGTGCTAGGTGT

**>ATB-KS-1411 [EF686944]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAACAGGGTAGCAATACCGCTGACGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACCTGCCTATAACTGGGGAATAGCTCCCTGAAAGGGGAATTAACACCGCATAACACTATTGATTCGCGATGGATTAGTAGTTAAGTGTAGCGATACAGGTTATAGATGGGCATGCGTGACATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCTACGATGCTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCCATGTCGCGTGACAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGTAAACTGCTTTTATAGTAGAAGAAACACATCTACGTGTAGATGTCTGCCAGTATACTATGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCGGGACTGTAAGTCAGGGGTGAAATACTGCAGCTTAAGTGTAGCATTGCCTTTGAACTGCCGTTCTTGAGTACAGTTGAGGTAGGCGGAATGTGGTGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATACCA CAGAACCGCGATTGCGAAGGCAGCTTACTAAGCTGTTACTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGATTACTGGTTGT

**>ATB-KS-1413 [EF686945]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCACGG  
GTAGCAATACCTGGTGGCGACCGGCGGAAGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACATGCCCTATACAGGGGAAT  
AAACCAGGGAACTTGGTCTAATGCCCCATAGCAATAAGATAAGGCATCTTATTTTATTTAAAGCTTCGG  
TGGTATAGGATTGGCTCGCGTGACATTAGCTGGATGGTGGGGTAACGGCCCACCATGGCGATGATGTCTA  
GGGGTTCTGAGAGGAAGACCCCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GAGGAATATTGGACAATGGATGGAATCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACGGCCCTATGGGTT  
GTAAACTGCTTTTCTACGGGAGCAATAAGGTCTACGCGTAGACTGATGAGAGTACCGTAGGAATAAGCAT  
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAA  
AGGGTGCGTAGGCGGCTTTTAAAGTCAGCGGTGAAATTTTGCAGCTTAAGTGTAAACAGTGCCGTTGATAC  
TGGGGAGCTAGGATTTGGTTGCTGTGGGTGGAATGTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGAGATCACACA  
GAATATCGATTGCGAAGGCAGCTCACAAAGCCAAGATTGACGCTGAGGCACGAAAGTGTGGGGATCAAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGATAACTCGCTGTCG

**>ATB-KS-1416 [EF686946]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAATACATGCAAGTCGAGGGGCAGCACGG  
GTAGCAATACTTGGTGGCGACCGGCGAATGGGTGCGTAACGCGTATGCAACCTACCTATAACTGGGGCAT  
AGCTCAGAGAAATCTGAATTAATTTCCCATATAACATTACTTGGCATCAAGTTTTGGTTAAAGTTCTGA  
CGGTTATGATGGGCATGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGATGTCTAG  
GGGTTCTGAGAGGATACACCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  
GGGAATATTGGGCAATGGACGCAAGTCTGACCCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACAGCCCTTATGGGTTG  
TAAACTGCTTTTATTTCGGGAAAAAACTTTTCGGACGTGTCCGGAATTGATGGTACCGTTTGAATAAGCATC  
GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAA  
GGGTGCGCAGGCGGATTTGTAAGTCAGTTGTGAAATCCTGTGGCTTAACTACAGAACTGCAATTGATACT  
GCAAGTCTAGAGTTTAGTTGAAGTGACTGGAATGTGTGATGTAGCGGTGAAATGCAAAGAGATGACACAG  
AACACCGATAGCGAAGGCAGGTCATAAGCTAATACTGACGCTCAGGCACGAAAGTGTGGGGATCAAACA  
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGATAACTAGTTGTTGGCGATACACAGTCAGC

**>ATB-KS-1417 [EF686947]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCGATG  
GTAGCAATACCAGTCGGCGACCGGCGGATGGGTGAGTAACACGATGCAACCTGCCTTCAACATTGGAAT  
AACCCGTTGAAAGACGGACTAATGCCTTATAACACAGGGGCGCCGATGGCGATATTTGTTAAAGATTTT  
ATCGGTTGAAGATGGGCATGCGCATGATTAGTTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGACAACGATCAT  
TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGAGGAATATTGGTCAATGAGCGAGAGCTTGAACCAGCCACGTCGCGTGCAGGAAGAAATGTCTTATGGA  
TTGTAAACTGCTTTTTTCGGTAGAGTAATGTGCGTCACGTGTGACGTATTGCAAGTATACCGAGAATAAGG  
ATCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTT  
AAAGGGTACGTAGGCGGGATGATAAGTCAGCGGTGAAATTTTGCAGCTTAAGTGTAAAGCTTGCCGTTGAA  
ACTATTATTCTTGAGTGTAGATAAGGTAGGCGGAATGTGTTGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATAACA  
CAGAACACCAATTGCGAAGGCAGCTTACCGGGTTACCACTGACGCTGAGGTACGACAGCGTGGGGATCAA  
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTCGCTGT

**>ATB-KS-1419 [EF686948]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTACACATGCAAGTCGAACGGAGAAAGGGT  
AGCTTGCTATCTTTTCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTACCCTTTGCAGGGGGATA  
ACAGCGAGAAATCGTTGCTAATAACGCATATAAAGTTTCTTTCGCATGAAAGAACTTAAAGATTTATC  
GGCAAAGGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGATAACAGCCCACCAAGGCAACGATCCATAG  
CCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGATGAAGGTCTTCGGATTGT  
AAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAGGGCCTTAAGGTCTATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAA  
CTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGTGC  
GTAGGTGGTTATGTAAGTTTGATGTGAAACC

**>ATB-KS-1420 [EF686949]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGATTCAAGGA  
GTAGGAGAACAGAGGCAAGAAGCAGGAGGGTCGTGTATGGCCCTGTTTGTTCCTGTTTCT  
GTTCTCTTGCTTCTTGGAGAGCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTGGGTGACCTGCCCCGGGAGACTGGGAT  
AACAGCTCGAAAGGGCTGCTAATACCGGATGATATCGCTTTATTATCATGAAGTGATCAAAGCGTTTAGT  
GCTCTCGGATGGGCCCCGCTCCCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGGCGATGGGTAG  
CCGGTCTGAGAGGATGGTCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG  
GGGAATTTTGCACAATGGGGGAAACCTGACGCAGCGACGCCGCTGAGTGATGAAGGCCCTTCGGGTTGT  
AAAGCTCTGTTGGGGGGGAAGATAGTGACGGTACCCCCCTGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAG  
CCGCGGTAAGACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCGTGAGGCGGCTTTTC  
AAGTCGGCTGTGAAAGTCCTCGGCTTAACCGGGGAGTGCGAGTCGAAACTGGGGAGCTTGAGTGCAGGAA  
AGGGTGGTGGAATTCCCGGTGGAGCGGTGACATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCCA  
CCACCTGGTCTGTTACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCCG

**>ATB-KS-1421 [EF686950]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTATTTT  
TTACAGACTTTCTACGGAGATGAAGTAGCTAATACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACC  
TGCCTTATACAGGGGAATAACAGCCGGAACGGTTGCTAAAACCGCATAACATGCATTTCATCGCATGATG  
AAAGCATCAAATATTTATAGGTATAAGATGGGCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGTGTCTCA  
CCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGAGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGTG  
AAGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAG  
GGAGCGTAGGTGGCATGTCAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGATTGCATTTGAAACTG  
ATATGCTAGAGTGACAGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA  
ACACAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
GATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTG

**>ATB-KS-1422 [EF686951]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGTTATTA  
TGAAGGTTTACCGGATTAATAACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGATAACCTGCCTTACACAG  
GGGGATAACAGCGAGAAATCGTTGCTAATAACCGCATAAGTAAAGGAACTGCATGGTTTTTTTTATAAAAC  
TTTAGTGGTGTAAGATGGATCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGATAACAGCCCACCAAGGCAACGAT  
CAGTAGCCGGCTTGAGAGAGTGAAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCA  
GCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCTGAAGGAAGAAGGTTTTTCG  
GATCGTAAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAAAAATGACAGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTAACTACG  
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGAATCACTGGGTGTAAAGGTGCGTAGG  
CGGTAGGGCAAGTCAGATGTGAAAGCCCGCAGCTCAACTGCGGGATTGCATTTGAAACTGTTCTACTAGA  
GTGCAGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCAGTGG  
CGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAAGTACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTCGGGGCCGACAGGTCTCGGTGCTGAAGTCAAC  
G

**>ATB-KS-1424 [EF686952]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTTTATT  
TTATAGATTTTCTTCGGAATTGAAGTAGTTTAACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACC  
TGCCCTCATACAGGGGAATAACAACCGGAAACGGCTGCTAAAACCGCATAATAAGAGAGATCGCATGATC  
TATCTTTTAAATATTTATAGGTATGAGATGGGCCCCGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGATAAAAGCTCA  
CCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGAGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGTG  
AAGAAGTATTTCCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAG  
GGAGCGTAGGTGGCAAATCAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGATTGCATTTGAAACTG  
GTATGCTAGAGTGACAGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA  
ACACAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAG  
GGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGAATACTAGGTGTC

**>ATB-KS-1425 [EF686953]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGAGTATTTT  
TTACAGACTTTCTTCGGAGATGAAGTAGCTAATACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACC  
TGCCTTATACAGGGGAATAACAGCCGGAACGGTTGCTAAAACCGCATAACATGCATTTCATCGCATGATG  
AAAGCATCAAATATTTATAGGTATAAGATGGGCCCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGTCTCA  
CCAAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTTGAGAGAGTGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCT  
CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTG  
AAGAAGTATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCG  
GCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAG  
GGAGCGTAGGTGGCATGTCAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCCCGGGATTGCATTTGAAACTG  
ATATGCTAGAGTGACAGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGA  
ACACAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAG  
GATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTTG

**>ATB-KS-1426 [EF686954]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGTTTACG  
GAGCAGCTTGCTGCACTGTAACTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCTTACACAGG  
GGGATACACTGGGAACTAGTGCTAATACCGCATAACATCATTTTATGGCATCATGAGATGATCAAAGGA  
GCAATCCGGTGTAAGATGGGCCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAGCGA  
TCGGTAGCCGAACGAGAGGTTGGTTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGC  
AGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGGAACCCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGCCTTC  
GGGTTGTAACTTCTTTGATTGGGGAAGAAATTTGACGGTACCCAAAGAAACAAGCCACGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGTGTAGGC  
GGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGGCTCAACCCCGGGCACTGCATCCGAAACTGTGTCTCTTG  
AGTGCTGGAGAGGGAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTTAGAGATTAGGAGGAACACCAG  
TGGCCAAAGGCGACTTTTCTGGACAGTAACGACGCTTAAGGCCGAGAAGCCTGGGGGAGCAAAACACG  
GATTAAATACCCCTGG

**>ATB-KS-1431 [EF686955]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGAAGCGATA  
AGCTTGCTTATCAAATCAGTGGCGAACGGGTGAGTAAGACATAAAATAATCTACCCCTAAGCCTGGGATAA  
CTAGAGGAACTTTAGCTAATACCGGATAGTTGAGAATAAGGCATCTTAATCTTATTAAAGATGGGAAAC  
ATCACTAAGGGATGAGTTTATGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGATAAGAGCCCACCAAGGCGATGATGCG  
TAGCCGATCTGAGAGGATGACCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTAGGGAATTTTCGGCAATGGGGGGAACCCCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAACGAGGAAGGTCTTTGGAT  
CGCAGAGTTCTGTTGTAAGGGAATAAACGATTATAGAGGGAATGCTATAATTTTGACGGTACCTTACCAG  
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGAATTATTG  
GGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGCTTAATAAGTTTGTGGTGAAATCGTGGGGCTCAACTCCATCAAGCCAC  
AAAACTGTAAAGCTAGAGGACAGTAGAGGCAAGTGGAATTCATGTGTAGCGGTAAACCGGTAGATAT  
ATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTTGCTGGACTGTAACGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGGA  
GCAATAGGATTAGATACCCCTAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAAG

**>ATB-KS-1432 [EF686956]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACTAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATTCTTTGA  
TTTATAGCAATATTTATTAAAGAGGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAATCTGCCTTTCAGAC  
GGGGACAACCTCAGGGAACTTGTGCTAATACCCGATGAGACCACAAGAAGGGATTTTTGTGGCCAAAGGC  
GGGCAGCAATGCTCGTGCTGAAAGATGAGTCTGCGTCCTATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGCCTACCA  
AGGCTAAGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGGGATG  
ACAGCTTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTATTAAGGAAAAAGATCTATATGCTAATATCATGTAGATTTGAT  
GGTACTTATTGAATAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTG  
TCCAGAGTTACTGGGCGTAAAGAGCGTGTAGGCGGTTGAAAAAGTCAGGTGTGAAATTCCTCGGCTCAAC  
CGAGGGACTGCGCTTGAACTTTTCGACTGGAGTTTGGGAGGGGCAACCGGAATTCCTGGTGTAACGGTG  
AAATGTGTAGATATCAGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGGTTGCTGGACCAAACTGACGCTGAGACG  
CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTGCTAGGTG  
TA

**>ATB-KS-1433 [EF686957]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGAAATATAT  
TGAAGATTTATCGGATATATATTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAATCTGCCTCACACAG  
GGGAATAACACTGGGAACTAGTGCTAATACCGCATGAAATAGTGAAGTGGCATCACTTTACTATCAAAG  
GAGCAATCCGGTGTGAGATGAGCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGCTCACCAAGGCGACG  
ATCGGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGG  
CAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGTTTT  
CGGATTGTAAACTTCTTTGATTGGGGACGATAATGACGGTACCCAAAAAACAAGCCACGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGTGTAGGC  
GGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGGCTCAACCCCGGCACTGCATCTGAAACTGTGTCTCTTGAG  
TGCTGGAGAGGAAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGGCTTTCTGGACAGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACC  
CCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTTCTGTGCCGGGAG  
TTAACACAATAAAGTAT

**>ATB-KS-1434 [EF686958]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGCGTCTTAAGCATGCAAGTCGAACGGCATGAGGA  
AGCTTGCTTCCTCAGAGAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACCTACCTTGAGATGGGGATAG  
CCATTAGAAATAGTGGATAATACCGAATACGCTCTACGGACTCTGGTTTGTAGAGGAAACAGGCTACGGC  
CTGGCTCGAGGATGGGCGCGCTCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGAGCCACCAAGGCGACGATGGG  
TATCCGGCCTGAGAGGGTGTACGGACACATTGGGACTGAGATACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCA  
GCTAAGAATATTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGGATGACGAAGGCCGAAAGGT  
TGTAAGAAATCCTTTTGCTGATGAAGAATAAGCGTGGTAGGGAATGACCGCGTGATGACATTAGTCGGTGAA  
TAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGGGGCAAGCGTTGTTCCGAATTATTG  
GGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTTGGTAAGCCTGATGTGAAATCCTGCAGCTTAACCTGTAGAATGCAT  
TGGGTACTGCCGAACCTGAATCACTGAGGGGAAACTAGAATTCCAGGTGTAGGGGTGGAATCTGTAGATA  
TCTGGAAGAATACCGGTGGCGAAGGCGGGTTTCTAGCAGATGATTGACGCTGAGGTGCGAAAGTGCGGGG  
AGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCACCGTAAACGATGTACACTAGGTGTCTG

**>ATB-KS-1435 [EF686959]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCGAGGCTTAGCACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAG  
AGTAGTTTACTATTCTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTAGTAGTGGGG  
GATAACTTGCCGAAAGGTAAGCTAATACCGCATAACGCTCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTT  
GCGCTATTAGATGAGCCTAGGTTCGGATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGACCGCGATCCGT  
AACTGGTCTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATT  
GTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGTTTCGTTACTAATATTAGCGAGCTTTGACGTTACCGACAGAAT  
AAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTCGTTAAGTTGGGAGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGCTTC  
CAAACTGGCGAGCTAGAGTATGGTAGAGGGTGGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
AGGAGGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTAATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGA  
GCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGT

**>ATB-KS-1436 [EF686960]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATCATCC  
TTTCGGGGGTGAGAGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTAGGTTATCTACCTCAAGACGGGGACAACC  
CAGGGAACTTTGGGCTAATACCGGATGTGAGCAACTTTTTAGTTGTTTGAAGGTGGCGTAAGCTGTCTGC  
TTGGGGATGAGCCTGCGTCCTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCAATGATAGGTAGGC  
GGCCTTAACGGGTGGTCGCCCACACTGGGATTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGA  
GAATAGTCTACAATGGTTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGATGAATCCCTTCGGGGTGTA  
AGTTCTTTTATATGTGAGCAGTGCTTCTTATATTAAGAGTATGGGGAGAGAGATATTAGCATATGAATAA  
GCAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAGGC  
GTAAAGGGCAGGCAGGCGGATCCATAAGTTTATCGTTAAGGCGTCGGCTTAACCGGCGTAGGGCGGTAG  
ATACTGTGGATCTGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGAGATCA  
GGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCGAGTCTTCCAAGCCGTTATTGACGCTCAACTGCGAAGGTGTGGGTATC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATAATCACTGGGTG

**>ATB-KS-1439 [EF686961]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGAATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATGGTGC  
TTTCGGGCATCAGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTAATCTACCCCTCAAGACGGGGACAACC  
CAGGGAAACTTTGGGCTAATAACCGGATGATAGCAGCAGCGATGTTGTTTAAAAGATGGCTTTCGGGGCTGTC  
GTTTGGGGATGAGCCTGCGTCCTATTAGCTAGTTGGTGTGGTAAAGGCACACCAAGGCGATGATAGGTAG  
GCGGCCTTAACGGGTGGTCGCCCACACTGGGATTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTC  
GAGAATAGTCTACAATGGTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGAGGAAGCCCTTCGGGGTGT  
AAAGTTCTTTTATATGTGAGCAGTGGGTCTACGTTAATAGCGTGGGATCAGGGATATTAGCATATGAAT  
AAGCAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAG  
GCGTAAAGGGCAGGTAGGCGGATCTATAAGTTTTTTGTCAAATTCACGGCTCACCCGTTGCGCGGCAGG  
AGATACTGTAGATCTGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGAGAT  
CAGGAGGAATACCTAAGGCGAAGGCAGTCTTCTAAGCCGTAATTGACGCTAAACTGCGAAGGTGTGGGTA  
TCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATAATCACTG

**>ATB-KS-1440 [EF686962]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATTTAGTCG  
TCGGTCATCAGACGTCAGACGTCAGGAAAAAGTGGTGAGCGGAACCCAGACATTGGGGAGAACCTGAAGG  
CAGAGGTTGTTGCAAAGACTATCCTTACGACCGATGTCCGATGACTGACGACCGAATAGTGGCGGACGGG  
TGAGTAACGCGTGGGTAACCTGCCCATAAGTGGGGAATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAA  
GCTGAGCAATCAGTAAAGGAGGCTAACGCTTCCGCTTATGGATGGGCCCCGCTCTGATTAGCTTGTTGGT  
GGGGTAATGGCCTACCAAGGCAACGATCAGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGGACGGGCCACACTGGGACTGAG  
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCCCTGACGCAGCG  
ACGCCGCGTGAGCGAAGAAGGCCTTAGGGTCGTAAAGCTCTGTTTTAAGGGACGAATATCTTCAGTAGTA  
ACTGACTGGGGAATGACGGTACCTTAAGAGAAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAAGAC  
GTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCACGTAGGCGGGATTTTAAGTCAGGTGTG  
AAAGACCGTGGCTCAACCACGGGGTTGCACATGAACTGGAATTCTTGAGGGCAGGGGAGGAAAGTGGA  
TTCTTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAAATCAGGAGGAACACCGGTG

**>ATB-KS-1442 [EF686963]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGGATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATCATCC  
TTTCGGGGGTGAGAGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTAGGTTATCTACCCCTCAAGACGGGGACAACC  
CAGGGAAACTTTGGGCTAATAACCGGATGTGAGCAACTTTTAGTTGTTTGAAGGTGGCGTAAGCTGTCGCT  
TGGGGATGAGCCTGCGTCCTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCAATGATAGGTAGGCG  
GCCTTAACGGGTGGTCGCCCACACTGGGATTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGAG  
AATAGTCTACAATGGTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGATGAATCCCTTCGGGGTGTAAA  
GTTCTTTTATATGTGAGCAGTGCTTCTTATATTAACAGTATGGAGAGAGCGATATTAGCATATGAATAAG  
CAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAGGCG  
TAAAGGGCAGGCAGGCGGATCCATAAGTTTATCGTTTAAAGGCGTCGGCTTAACCGGCGTAGGGCGGTAGA  
TACTGTGGATCTGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGAGATCAG  
GAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGTCTTCCAAGCCGTTATTGACGCTCAACTGCGAAGGTGTGGGTATCA  
AACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATAATCACT

**>ATB-KS-1443 [EF686964]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGGGGTACTG  
CGACAGATCCCTTCGGGGTGACGTTGCTTTAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTA  
CCCTAAAGCTCGGGATAACAGTGGGAAACCGCTGCTAATACCGGATGACTTTAACCTATGGCATCATGGG  
TTAAAGAAAGATTTATCGCTTTAGGATGGGCCCCGCTCCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  
AAGGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGAGAAGGTGTACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCC  
TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCGCAATGGACGGAAGTCTGACGCAGCGACGCCGCTGAGCGAT  
GAAGGCCTTCGGGTGCTAAAGCTCTGTCTTTGGGGAAGAAGGTCTTCGGACTTGACGGTACCCAAGAAGA  
AAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGG  
GCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGCCCTTTAAGTCAGATGTGGAAGGCCACGGCTTAACCGTGGGATTGCATT  
TGAAACTGGAGGGCTTGAGTGTGCGAGAGGGTAGTGGAATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATAT  
TGGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCAGTACCTGGACGATAACTGACGCTGAGGCACGAAAGCTAGGGGA  
GCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCTTAGCCGTAAACGATG



**>ATB-KS-1444 [EF686965]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGAGCGAACGCTGGCGGCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAGCGCCCAGCAAT  
GGGAGCGGCAGACGGGTGAGTAACGCGTGGGGATCTACCCATTGGTACGGAATAACCCAGGGAACTTGG  
ACTAATACCGTATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCAATGGATGAACCCGCGTCGGATTAGCTAT  
TGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGAC  
TGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCC  
AGCCATGCCGCGTGTGTGATGAAGGCCTTAGGGTTATAAAGCACTTTCGCCCGTGAAAGATAATGACGGTA  
ACCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCG  
GAATCACTGGGCGTAAAGCGCACGTAGGCGGATCGTTAAGTCAGGGGTGAAATCCTGGGGCTCAACCTCA  
GAACTGCCCTTGATACTGGCGATCTCGAGTTCGAGAGAGGTTGGTGGAATCCTGAGGTGTAAGGTGAAAT  
TCGTAGATATTTCGGAAGAACACAGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGCTCGATACTGACGCTGAGGTGCGAA  
AGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGGATGCTAGCCGTTGGG  
GAGCTTGCTCTTCAGTGGCGCAGCTAACGCCTTAAGCAT

**>ATB-KS-1446 [EF686966]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACTAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGATTCTTTGA  
TTTATAGCAATATTTATTAAAGAGGAGTGGTGAACGGGTGAGTAACACGTAGATAATCTGCCTTTCAGAC  
GGGGACAACCTCAGGGAACTTGTGCTAATACCCGATGAGACCACAAGAAGGGATTTTTGTGGCCAAAGGC  
GGGCAGCAATGCTCGTGCTGAAAGATGAGTCTGCGTCTATCAGCTAGTTGGTGGGGTAAATGCCTACCA  
AGGCTAAGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATTTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCGACGCCGCGTGAGGGATG  
ACAGCTTTCGGGTTGTAAACCTCTTTTATTAAAGGAAAAAGATCTATATGCTAATATCATGTAGATTTGAT  
GGTACTTATTGAATAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTG  
TCCAGAGTTACTGGGCGTAAAGAGCGTGTAGGCGGTTGAAAAAGTCAGGTGTGAAATTTCTTCGGCTCAAC  
CGAGGGACTGCGCTTGAAACTTTTCGACTGGAGTTTGGGAGGGGCAACCGGAATTCCTGGTGTAACGGTG  
AAATGTGTAGATATCAGGAGGAACACCCGTGGCGAAGGCGGGTTGCTGGACCAAACTGACGCTGAGACG  
CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTA

**>ATB-KS-1450 [EF686967]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGTTTACG  
GAGCAGCTTGCTGCACTGTAAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCTTACACAG  
GGGGATAACACTGGGAACTAGTGCTAATACCGCATAACATCATTTTATGGCATCATGAGATGATCAAAG  
GAGCAATCCGGTGTAAGATGGGCCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAGC  
GATCGGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGGTCCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGGAACCCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAAGGATGAAGGCCT  
TCGGGTTGTAAACTTCTTTGATTGGGGAAGAAATTTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTAAGGGTGTAAAGGGCGTGATG  
GCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGGCTCAACCCCGGCACTGCATCTGAAACTGTGTCTCTTG  
AGTGCTGGAGAGGAAAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAGGAACACCAAGTG  
GCGAAGGCGACTTTCTGGACAGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAGAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGT

**>ATB-KS-1452 [EF686968]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGCGTCTTAAGCATGCAAGTCGAACGGCAAGGCAG  
GTGCTTGACCTGCCCTAGAGTGGCGGACTGGTGAGTAACACGTGGGTGACATGCCTTTTAGTTGGGGAT  
AGCTACTAGAAATAGTAGATAATACCGAATGTGATCAATATTTATAGATGATGTTGAGGAAAGGAGCTAA  
GGCTTCGCTAAAGATTGGCCCCGCGGCCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCTTACCAAGGCGATGAT  
GGGTATCCGGCCTGAGAGGGTGATCGGACACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCA  
GCAGCTAAGAATATTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCGACGCCGCGTGATGATGAAGGCCGAAA  
GGTTGTAAAATCCTTTTACACTGGAGGAATAAGCAGAGTAGGGAATGACTCTGTGATGACTGTACAGTTT  
GAATAAGCAACGGCTAATTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGTAAGTTGCGAGCGTTGTTCCGGAATTA  
TTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGATTTGCAAGCTTGATGTGAAATCCCGCAGCTTAACTGCGGAACCTG  
CATTGGGAACTGCAAGACTAGAGTTACTGAGGGGAACTAGAATTCAGAGTGATAGGGGTGAAATCTGTAG  
ATATTTGGAAGAATACCAATGGCGAAGGCAAGTTTCTGGCAGACAACTGACGCTGAGGTGCGAAGGTGCG  
GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCGCACAGTAAACGATGTACACTAG

**>ATB-KS-1454 [EF686969]**

AGAGTTTGCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGGGGTTACT  
TCGTTGAGATCTTCGGATCAAAGCGAAATAACTCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTG  
CCTTTTGCTGGGGAATAACTGTGGGAAACCATGGCTAATACCGCATGTTGTGCATGACAGGCATCTGTTA  
TGTATGAAAGGAGAAATCCGGCAGAAGATGGGCTCGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTGGGGTAACGGCCTA  
CCAAGCCCGCATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTGACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC  
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGAAAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAAGGA  
CGAAGGCCTTCGGGTTGTAACTTCTTTGGGGAGGGACGAAAATGACGGTACCTCCAGAACAAGCCACGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGG  
GCGCGCAGGCGGCCCAAAAGTCAGATGTGAAAGATCAAGGCTTAACTTTGACATGTCATCTGAACTTT  
GGGACTTGAGTATCAGAGGGGAAAGCGGAATTCCTGGTGGAGCGGTAAAATGCGCAGAGATCAGGAGGAA  
CACCAGGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGCTGACAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGG  
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTACTGGGTGTAG

**>ATB-KS-1461 [EF686970]**

AGAGTTTGCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATCATCC  
TTTCGGGGGTGAGAGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTAGGTTACCTACCTCAAGACGGGGACAACC  
CAGGGAACTTTGGGCTAATACCGGATGTGAGCAACTTTTTAGTTGTTGAAAGGTGGCGTAAGCTGTGCG  
TTGGGGATGAGCCTGCGTCCTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCAATGATAGGTAGGC  
GGCCTTAACGGGTGGTGCCTCACACTGGGATTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGA  
GAATAGTCTACAATGGTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGATGAATCCCTTCGGGGTGTA  
AGTTCTTTTATATGTGAGCAGTGCTTCTTATATTAAGAGTATGGGGAGAGAGATATTAGCATATGAATAA  
GCAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAGGC  
GTAAAGGGCAGGCAGGCGGATCCATAAGTTTATCGTTTAAAGGCGTCGGCTTAACGGCGTAGGGCGGTAG  
ATACTGTGGATCTGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGAGATCA  
GGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGTCTTCCAAGCCGTTATTGACGCTCAACTGCGAAGGTGTGGGTATC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATAATCACTG

**>ATB-KS-1485 [EF686971]**

AGAGTTTGCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGAGGTTATGT  
TGTGGACATCCTTCGGGAGGGAAGCGATATGACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAATCTG  
CCCTAAAGCTCGGGATAACAGTGGGAACTGCTGCTAATACCGGATGACTTTATCGGGAGGCATCTTCGG  
ATAAAGAAAGTGGTCAATCATTGATTGACCAGCGCTTTAGGATGAGCCCGCGTCCCATTAGCTAGTTAGT  
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAG  
ACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCGCAATGGAGGGAACTCTGACGCAGCG  
ACGCCGCGTGAGCGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGGAAGAAGGGTGCGAAGCATC  
TTGACGGTACCTAAGGAGGAAGCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAG  
CGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTTTTAAAGTCAGATGTGAAAGACCACGGC  
TTAACCGTGGGGTTGCATTTGAACTGGAGGGCTTGAGTATCGGAGAGGGTAGTGGAATTTCCAGTGTAG  
CGGTGGAATGCGAGATATTGGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACGAAAACCTGACGCTGA  
GGCACGAAAGCTAGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCTTAGCCGTAAACGATG

**>ATB-KS-1487 [EF686972]**

AATTCACAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTTCTGGAC  
GACAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA  
AACGATGGATACTAGGTGTAGGAGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGGAGTTAACACAATAAGTATCCCACC  
TAGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCACAAAGCAGTGGAGTATGTG  
GTTTAATTCGAAGCAACGCAAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATACAGTCGGATGTGGTGAAACACTGC  
AGTCCTTCGGGACGGCTGTACAGGTGGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTGGGCACTCTAACGAGACTGCCGGT  
GACAAATCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGTTCTGGGCTACACACGTACT  
ACAATGGCTATTACAGAGGGAAGCGAAGGAGCAATTTCGGAGCAAATCCCCAAAAATAGTCCCAGTTCGGA  
TTGTGGGCTGCAACCCGCCACATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGTCAGCATACTGCCGTGAAT  
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCCGCCGTCACACCATGAGAGTCTGCAACACCCGAAGTCAGTAGTCTA  
ACCAGCAATGGGGACGCTGCCGAAGGTGGGGCCGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA

**>ATB-KS-1488 [EF686973]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCATCGCGG  
TTCCGGCAACGGGACCGGCGGCGACCGGCATACGGGTGCGTAACGCGTGAGCGACATTCCCGGGACCGGG  
GTATAACCGACGGAAACGTCGCCTAATCCCCGTAACACCATCGGGCGCATGCCCTTTGGTTGAAAGCTC  
CGGCGGTCCCGGATTGGCTCGCGTCCCATTAGGCGGATGGCGGGGTAACGGCCCACCATACTACGATGG  
GTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGACGACGGCCCTACGG  
GTTGTAAACCGCTTTTGCAGGGGAGCAATAAGGGGGTTTCGTACCCCCGACGAGCGTACCCTGCGAATCA  
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGT  
TTAAAGGGTGCGTAGGCTGTGCGTCAAGTCAGGGGTGAAATTCCGTGCGTCAACGTCGGTTGTGCCCTTG  
ATACTGGCGTGCTGGAGTACGGATGCCGCCGAGGAATGAGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCA  
CTCAGAACACCGATTGCGAAGGCATCTGGCGAATCCGTCACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATA  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTATTCCACGCCGTAAACGATGATGACTAGCCGCCG

**>ATB-KS-1491 [EF686974]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCATCGCGG  
TTCCGGCAACGGGACCGGCGGCGACCGGCATACGGGTGCGTAACGCGTGAGCGACATTCCCGGGACCGGG  
GTATAACCGACGGAAACGTCGCCTAATCCCCGTAACACCATCGGGCGCATGCCCTTTGGTTGAAAGCTC  
CGGCGGTCCCGGATTGGCTCGCGTCCCATTAGGCGGATGGCGGGTAACGGCCCACCATACTACGATGGG  
TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAAGACACGGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGCA  
GTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGACGACGGCCCTACGGG  
TTGTAAACCGCTTTTGCAGGGGAGCAATAAGGGGGTTTCGTACCCCCGACGAGCGTACCCTGCGAATCAG  
CACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTT  
TAAAGGGTGCGTAGGCTGTGCGTCAAGTCAGGGGTGAAATTCCGTGCGTCAACGTCGGTTGTGCCCTTGA  
TACTGGCGTGCTGGAGTACGGATGCCGCCGAGGAATGAGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCAC  
TCAGAACACCGATTGCGAAGGCATCTGGCGAATCCGTCACTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATAA  
AACAGGATTAGATACCCTGGTATTCCACGCCGTAAACGATGATGACTAGCCGCCGGCGACACGCTGTC

**>ATB-KS-1492 [EF686975]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGTTGGCGGTGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGGTGACCTTT  
TTGTAGTAATACGAAATTGTCATAGTGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTTGGTGATCTGCCTCGAAGTGTG  
GAATAACGTTCCGAAAGGAACGCTAATACCGCATGTGCTCTCAGTCTTTAGAAAAGTTGAGAGTAAAGGAT  
TTATTTCGCTTCGAGAGGAGCCTGCGTCCCATCAGCTAGTTGGTAGGGTAATAGCCTACCAAGGCTTTGAC  
GGGTAGGGGACCTGAGAGGGTGGCCCCCACAATGGAAGTGAACACGGTCCATACACCTACGGGTGGCA  
GCAGTAGGGAATATTAGAAATGGACGAAAGTCTGATCTAGCGACACCGCGTGTCGGAAGAAAGCCTTCGG  
GTTGTAAAGCACTTTTTTGGAGGGAATAGGAAGGAAGGTACTTCCAGAATAAGTCTCGGCTAACTACGTGC  
CAGCAGCCGCGGTAACACGTAGGAGGCAAACGTTATCCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGCGTGTTAGGTGG  
TTCTGTAAGTAGGGCGTGAAAGCTCCCGGCTCAACTGGGAGAGGCGGTTCTATACTGCAGAGCTAGAGGA  
TGGTAGAGGGAGGTGGAATTCCAGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCTGGAGGAACACCAGTGGCGA  
AGGCGGCCTCCTGGACCATTCTTGACACTCAGACGCGAAAGCTAGGGTAGCAAACGGGATTAGAGACCCC  
GGTAGTCCTAGCCCTAAACGATGTAGACTAGACGTCGGCGGTGTAATAACTGTCTG

**>ATB-KS-1494 [EF686976]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAA  
AGAAGCTTGCTTCTTTGCTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG  
GATAACTTGCCGAAAGGTAAGCTAATACCGCATACGTCTACGGGAGAAAGCAGGGGAGCCTTCGGGTCC  
TTGCGCTATTAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTTGTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCC  
GTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACCGGGACTGAGACACGGCCCGGACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTTGAAGAAGGTCTTCGGA  
TTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCTCCGGGTAAATACCCTGTGAGTTTTGACGTTACCAACAG  
AATAAGCACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC  
TGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTGGAAGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAATTGC  
TTTCAAACTGGCGGGCTAGAGTACGGTAGAGGGTAGTGGAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGA  
TATAGGAAGGAACATCAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGG  
GGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCAACTAGTTGTTG

**>ATB-KS-1503 [EF686977]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGCTAAAGTCT  
CTTCGGAGATGATTAAAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCTCGTAGATAATCTGCCCTTGAGCCCCGAGATAAC  
CCTGGGAAACTGGGGCTAATACCGGATGACGCACAATTTTTGGATAGATTGTGTTAAAGTGGCGCAAGTC  
ACACTTGGGGATGAGTCTGCGACCTATCAGCTAGTTGGTTGGGTAATGGCTAACCAAGGCAATGACGGGT  
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG  
TAGGGAATATTGCGCAATGGGGGGAACCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTTCTGGT  
TGTAAGCTCTGTATAGAGGGAAGAATGTCAGGTGTTAAACAAGCCTGAGTGACGGTACCTCTGAAGTAAG  
GACCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGGTCTAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCG  
TAAAGGTGCGCAGGCTGATAATCGTGTGAGGTGTGAAATCCCCGGCTTAACCGGGGCATTGCGCTTGA  
AACTGGTTGTCTAGAGCATGTGAGGGGTAAAGCGGAATTCCCGGAGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGG  
GAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGGACATTGCTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCG  
AACGGGGATTAGATACCCCGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTGGATGTCAGT

**>ATB-KS-1505 [EF686978]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGGCTGTA  
CGAAGTATTTCCGTACAGAATACGGCCTTAGTGCGCAACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCCCAG  
ACTGGGGGATAACATTGTGAAAACAGTGCTAATACCGCATGATAGGGCTCCGGGCATCCGGAGCGCTTGA  
AAGGAGTAATCCGGTCAGGGATGGGCCCCGCTCCAATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAACGGCCCACCAAGGC  
GACGATTGGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCGACGCCGCGTGAAGGATGAAGG  
TCTTCGGATTGTAAACTTCTTTGATCAGGGAAGAAAGAAATGACGGTACCTGAAAAACAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGCG  
TGTAGGCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATCCCGCGGCTCAACCGCGGAACTGCATCTGAAACTGCGTC  
TCTTGAGTGTGCGAAGGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACAC  
CGGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGACGACAACCTGACGCTGAGACGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATT  
AGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTA

**>ATB-KS-1506 [EF686979]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGTTTATC  
GGATTAGCTTGCTAAACTGATAAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAATCTGCCTCATAAC  
AGGGGGATAACAGGTGGAACACCTGCTAATACCGCATAAGACTCCACTACCGCATGGTAGAGAAGTCAA  
AGGGATTACCGGTATGAGATGAGCTCGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTAGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGA  
CGATGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGA  
GGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGAGGGAACCTCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTT  
TTCCGATCGTAAACTCTGTCAATTGGGGAAGAATAAATGACGGTACCCAATGAGGAAGCCCCGGCTAACT  
ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGTACGT  
AGGCGGCTATATAAGTCAGGTGTGAAATACAGTGCTTAACACTGGAATTGCATTTGAAACTGTGTAGCT  
TGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAGGAACACCAG  
TGGCGAAGGCGACTTTCTGGACTGTAACCTGACGCTGAGGTACGAAAGCGTGGGTAGCGAACAGGATTAGA  
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGGGGTATCGAC

**>ATB-KS-1507 [EF686980]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGCGGTATGTGCT  
TTAGTGCATACAGCGGCAGACGGGTGAGTAACACGTATCTAACCTTCCCCTTACTTGGGCATAGCCTCTG  
GAAACGGAGATTAATTTCCGATGTGGTGTACATTTGCGATGTTTTGCGCACCAAAGATTTATCGGTAAGG  
GATGGGGATGCGCTCCATTAGGTTGTAGGTAGGGTAATGGCCTACCTAGCCTATGATGGATAGGGGTTCT  
GAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAACCTGCGACACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATA  
TTGGTCAATGGCCGGAAGGCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGCAGGATGACTGCCTTATGGGTTGTAAACTG  
CTTTTTTACGGGAATAATTATGATCACGTGTGATTATTTGCATGTACCGTAAGAATAAGGATCGGCTAAC  
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCTAGTGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAAAGGGAGCG  
TAGGCGGGAGGTCAAGTCAGCTGTGAAATGTATCTGCTTAACGGGTACACTGCAGTTGAAACTGGTTTTTC  
TTGAGTGCCTAAGAGGCAGGCGGAATTCGTTGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATGACGAGGAACCTCT  
ATTGCGAAGGCAGCTTGCTGGGTCGTTACTGACGCTGATGCTCGAAGGTGCGGGGATCAACAGGATTAG  
ATACCCTGGTAGTCCGCACAGTAAACTATGGATACTCTCTGCCGGCGATACAT

**>ATB-KS-1510 [EF686981]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGGTACAA  
TGAGAGCAATCGAGATGTACTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTGCCTATCACAGGG  
GGATAAGGCGGCGAAAGCCGCTCTAATACCGCATGAGACCCCTCAAAGCGATGCAATGGGGGTGAAAGGAG  
CGATCCGGTGAGAGATGGGCTCGCGTCCGATTAGGTAGTTGGTAGGGTAAGGGCTACCAAGCCAATGAT  
CGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGAAGTGAAGACGGTCCAAACTCCTACGGGAGGCA  
GCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGCGGAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCGTGAGGGGAAGAAGGTTTTTCG  
GATTGTAAACCTCTGTTCTTGGGGAAGAGGAAGAGACGGTACCCAAGGGGGAAGCCCCGGCTAACTACGT  
GCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGCGCGCAGGC  
GGCCTGTCAAGTCAGTAGTGGAAGTCCATTTTTCAAGGATGGAAGTGCTATAGAACTGATGGGCTTGAG  
TGCAGGAGAGGTTATCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGAGGAACACCAGTGGC  
GAAGGCGGGTAACTGGACTGCAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC  
CTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGAATGCTAGGTGTAGG

**>ATB-KS-1516 [EF686982]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGAGTGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGAACGGAC  
TATAGCTTGCTATAGTTGTAGCTAAGTGGCGCACGGGTGAGTAATGTATAGGTAATATGCCTCTTACTA  
AGGGATAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCTTATATTCCTTTTATGCATAAGTATAAAAAGGGAAAGAT  
TTATTGGTAAGAGATTAGCTTGTATTGTATCAGTTAGTTGGTGAGTAATGGCTCACCAAGACAATGACG  
CATAACTGGTTTGAGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACCGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG  
CAGTGGGGAATATTGCACAATGGACGGAAGTCTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGATGACACATTTTCGG  
TGCGTAAACTCCTTTTATATGAGAAGATAATGACGGTATTATATGAATAAGCACCGGCTAACTCCGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGGGGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATCACTGGGCGTAAAGAGCATGTAGGCGGA  
TTGATAAGTTTGAAGTGAATCCTATAGCTTAACTATAGAACTGCTTTGAAAAGTGTAACTTAGAATGT  
GGGAGAGGTAGATGGAATTTCTGGTGTAGGGGTAAAATCCGTAGATATCAGAAGGAATACCGATTGCGAA  
GGCGATCTACTGGAACACTATTGACGCTGAGATGCGAAAGCGTGGGGGGCAAACAGGATTAGATACCCTG  
GTAGTCCACGCCCTAAACGATGTACACTAGTTGTTGTGAGGCTAGACCTTGCA

**>ATB-KS-1517 [EF686983]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGAGGCATAG  
GGAAGAAGTTTTTCGGATGGACTCCCTATGCTTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTGCC  
TTTCACAGGGGGATAAGGCGGCGAAAGCCGCTCTAATACCGCATGAGACCAGGTGATGATGTCACAGGG  
GTCAAAGGAGCAATCCGGTGAAGATGGGCTCGCGTCCGATTAGGTAGTAGGTGGGGTAAGGGCTCACCT  
AGCCAATAATCGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGAAGTGAAGACCGTCCAAACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGGGGGAACCTGACCCAGCAACGCCGCGTGAGGGAAAG  
AAGGTTTTTCGGATTGTAAACCTCTGTTCTTGGGGAAGAGTAGAAGACGGTACCCAAGGAGGAAGCCCCGG  
CTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCGAGCGTTGTCCGGAATGATTGGGCGTAAAGG  
GCGCGTAGGCGGCTGTGCAAGTCAGTAGTGGAAGCCCAGCTTTTAAGGTTGGAAGTGCTATTGAAACTGT  
GCAGCTTGAGTGCAGGAGAGGTTATCGGAATTCCCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCGGGGGGAA  
CACCAGTGGCGAAGGCGGGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT  
ATTAGATACCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGAATGCTAGGTGTAGGGGGTATCGACCCCTTCT

**>ATB-KS-1519 [EF686984]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACGCATGCAAGTCGAGGGGCATCGCGG  
TTCCGGCAACGGGACCGGCGGCGACCGGCATACGGGTGCGTAACGCGTGAGCGACATTCCCGGGACCGGG  
GTATAACCGACGGAACGTCGCCTAATCCCCGTAACACCATCGGGCGCATGCCCTTTGGTTGAAAGCTC  
CGGCGGTCCCGGATTGGCTCGCGTCCCATTAGGCGGATGGCGGGGTAAACGGCCACCATACTACGATGG  
GTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACAATGGAAGTGAAGACCGTCCATACTCCTACGGGAGGCAGC  
AGTGAGGAATATTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCGGGACGACGGCCCTACGG  
GTTGTAAACCGCTTTTGCAGGGGAGCAATAAGGGGGTTTTTCGACCCCCGACTAGCGTACCTTGCGAATCA  
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGT  
TTAAAGGGTGCGTAGGCTGTGCGTCAAGTCAGGGGTGAAATCCGTGCGTCAACGTCGGGTGTGCCCTTG  
ATACTGGCGTGCTGGAGTACGGATGCCGCCGGAGGAATGAGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGATATCA  
CTCAGAACACCGATAGCGAAGGCATCTGG

**>ATB-KS-1524 [EF686985]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGGATTTCAGAT  
GTTAGACAGTAGATATTGAGAGAGTTTAAGATTTAATATCTAATGTCTAATATCTGGATTAGTGGCGGAC  
GGGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTGCCTTACAGAGGGGGATAACATTCGGAAACGGATGCTAATACCGCA  
TAACATATATATACGGCATCGTATAAATATCAAAGGAGCAATCCGCTGTAAGATGGGCTCGCGTCCGATT  
AGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCAACGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGACCGGCCACA  
TTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGC  
CTGATGCAGCAACGCCGCGTGAGGGAAGACGGTCTTTCGGATTGTAAACCTTTAACTTTGGAGAAGAAAGC  
AATGACGGTATCCAAAGGAGCAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA  
GCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGGCGGGAAGGCAAGTCGGCTGTGAAATGCACAGG  
CTTAACCTGTGAATTGCAGTAGAACTGTTTTCTTGAGTGGAGTAGAGGCAGGCGGAATTCCGAGTGTA  
GCGGTGAAATGCGTAGATATTTCGGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGGCTGCTGGGCTCTAACTGACGCT  
GAGGCTCGAAAGTGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAC

**>ATB-KS-1915 [EF686986]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGCGCCTAACACATGCAAGTCGAACGAGAATCAGC  
TGATGAAGTTTTTCGAATGGATTTCGGTTGAGGAAAGTGGCGAACGGGCGAGTAACGCGTGAGCAACCTACC  
TTGTACTGGGGGATAACGTCGGGAAACCGGCGCTAATACCGCATAACATTACGATAGCGCATGTTATTGT  
AATCAAAGCTTTAGTGGTACGAGACGGGCTCGCGTCCAATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAA  
GGCGACGATTGGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCGCATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGAAACCTTGACGCAGCGACGCCGCGTGAAGGAAGA  
AGGCCTTCGGGTTGTAACTTCTTTGATCGGGGACGAAAATGACGGTACCCGAGGAACAAGCCACGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGCGTAAAGGGCG  
TGTAGGCGGGGGGACAAGTCAGATGTGAAATACCGCGGCTTAACTGCGGGGGTGTCATCTGAACTGTTCT  
TCTTGAGTGTGCGAGAGGAAAGTGGAATTCAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTGGGAGGAACAC  
CAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGACGATAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT  
AGATACCCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGGATACTAGGTGTAGGAG

**>ATB-KS-1921 [EF686987]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGAAGCAATGA  
AACGGAAGTTTTTCGGATGGAAGAATCATTGACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGC  
CTCATAACAGGGGATAACAGTTGGAAACGGCTGCTAAAACCGCATAAGCCTACAGTATCGCATGATACAG  
TAGGAAAATATTAATAGGTATGAGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCA  
AGGCGACGATCAGTAGCCGACTTGAGAGAGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCT  
ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGTGAAG  
AAGTATTTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAAGGAAGATAATGACGGTACTTGACTAAGAAGCCCCGGCT  
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGA  
GCGTAGGTGGTATGGTAAGTCAGATGTGAAAGCCCAGGGCTCAACCTGGGATTGCATTTGAAACTGCCA  
AACTAGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACA  
CCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACCTGACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGAT  
TAGATACCCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAATACTAGGTGTCTG

**>ATB-KS-1923 [EF686988]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGTGGCGTGTTTTATACATGCAAGTCGAGCGAGGACAGTA  
GCTTGCTACTGAGCCGAGCGGCGAACGGGTGAGTAACGCGTAAGCAATCTGCCCCACAATCGGGAACAAC  
CGTGCCAACGCGCGGCTAATGCCGATATTGTGTCTACTGCATAGTAGGTTAACGAAAGATTTATCGTT  
GTGGGATGAGCTTGCGTCCGATTAGCTAGTTGGCGGGGTAATAGCCACCAAGGCAGCATCGGTAGCCG  
GCCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGG  
AATATTGCGCAATGGGGGAAACCTTGACGCAGCAACGCCACGTGTGGGAAGAAGCATTTTCGGTGTGTAAA  
CCACTGTGCGAAAGGAATAACGGAAGACTTTCGGTCTTTATGAATGTACTTTTAGAGGAAGCACCGGCAAA  
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAGGGGTGCAAGCGTTGTTTCGGAATCACTGGGCGTAAAGGGAGC  
GTAGGCGGAAGTGCAAGCAATCTGTATAATCCTGGGGCCCAACCCAGTTCTGCAGATTGGACTGTATTT  
CTTGAATAGTTTCAGAGGCAAGCGGAATTTCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCAGAAAGAACACC  
AATGGCGAAGGCAGCTTGCTGGGGACTTATTGACGCTGAGGCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTA  
GATACCCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGCATACTGGGTGTCCGAAATTCG

**>ATB-KS-1929 [EF686989]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGTGGATAAGGCATGCAAGTCGAACGACGGCCCTG  
AAGCAGATCTTCGGAGAAGTGGACGGGATACGGAGTGGCGAAAGGGTGAGTAACACGTGAGCAATCTGCC  
CTTTTGTAGGGGATAACGCAGGGAAACCTGCACTAATACCGTATGTGGCCCGAGTACACCTGTACTTGGC  
GCTAAAGGTGGGGATCTTCGGACCTGCCACAAAAGGATGAGCTCGCGCACTATTAGCTAGTTGGTGTGGT  
AACGGCGCACCAAGGCGATGATGGTTAGCTGGTCTGAGAGGATGGTCAGCCACACTGGGACTGAGACACT  
GCCCAGACTCCTACGGGAGGCTGCAGTCGAGAATCATTCGCAATGCGCGAAAGCGTGACGATGCGACGCC  
GCGTGGAGGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAACTCCTGTCAACAGGTAATAAAGCACTGTTGATTAAAGAGT  
TGATGGTGTGAGCAAACCTGGGGAGGAAGCCACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGG  
GTGGCGAGCGTTGTTTCGGATTTACTGGGCGTAAAGGGTCCGTAGGGGGCTGTGTAAGTCGGGTGTGAAAT  
CTTCAGGCTTAACCTGGAATGTGCACTCGAACTGTGCGGCTAGAGTATAGGAGAGGAAAGTGGAATTCC  
CGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGGGAGGAACACCAGCGGCGAAGGCGGCTTTCTGGCCTATGAC  
TGACCCTGATGGACGAAAGCTAGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAG

**>ATB-KS-1932 [EF686990]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAAACAGGG  
GTAGCAATACCTGCTGACGACCGGCGTACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACCTGCCCTATACAGGAGGAT  
AGCCCCGAGAAATTCGGATTAATACTCCATGTAGCATTTTTTTCGCATGAATTAGATGTTAAAGATTTAT  
CGGTATAGGATGGGCATGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCATCGATGGGT  
TGGGGTCTTAAAGGATGGTCCACACACTGGCACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GAGGAATATTGGTCAATGGGTGAGAGCCTGAACCAGCCATCCCCGCGTGCAGGATGACGGTCCTAGTGATT  
GTAAACTGCTTTTTCTATGAGATGAATAAGAATTACGTGTAGTTCGATGACCGTATTATAGGAATAAGCAT  
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTAGGTTTAA  
AGGGTGCGTAGGTGGGCGTTTAAAGTCAGTGGTTAAAGCCATTAGCTTAACTAATGTATGCCATTGATACT  
GGATGTCTTGAATGTGGTAGAGGTAGGCGGAATGTGTTGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATAACACAG  
AACACCGATTGCGAAGGCAGCTTACTATTCCATTATTGACGCTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACA  
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACTATGATCACTCGTTTTTG

**>ATB-KS-1934 [EF686991]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAGAGGGG  
AGCTTGCTCTCCTTGAGACCGGCGGACGGGTGAGTAGCGGTATGGAATCTGCCTTGATACAGGGGAATAG  
CCCAGGGAAACTTGGATTAATGCCCCATAGTGTTGAGGGGCGGCATTGTTCTTCAACTAAAGATTTATCG  
GTACAAGATGACCATGCGTCCCATTAGCTTGTGGTGTTGTAACGGCACACCAAGGCTACGATGGGTAGG  
GGCCCTGAGAGGGGGATCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGA  
GGAATATTGGACAATGGGCGAGAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGCAGGAAGACTGCCCTATGGGTTGT  
AAACTGCTTTTTTATACGGGAAGAAACACTCCGACGTGTGCGGGCTTGACGGTACCGTATGAATAAGGATCG  
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGAAATCATTGGGTTTAAAG  
GGTCCGTAGGCGGACAATTAAGTCAGCGGTGAAAGTCTGTAGCTCAACTATAGAAGTGGCGTTGATACTG  
GTTGTCTTGAATCAATGTGAAGTGGCTAGAATATGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCACATAGA  
ACACCGATTGCGAAGGCAGGTCACCTAACATTGCATTGACGCTGATGGACGAAAGCGTGGGGAGCGAACAG  
GATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGGATACTAGCTGTCCGGCCTACATTGGTAGGCT

**>ATB-KS-1940 [EF686992]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGGAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGTAAACAGAG  
GTAGCAATACTTGCTGACGACCGGCGTACGGGTGAGTAACGCGTATGCAACCTGCCCTATACAGGAGGAT  
AGCCCCAAGAAATTCGGATTAATACTCCATGCAGCATATTTTTTCGCATGATAAATATGTTAAAGATTTAT  
CGGTATAGGATGGGCATGCGTCCCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCTTCGATGGGT  
TGGGGTCTAAAAGGATGGTCCACACACTGGCACTGAGACACGGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GAGGAATATTGGTCAATGGGCGAGAGCCTGAACCAGCCATCCCCGCGTGCAGGATGACAGTCCTAGTGATT  
GTAAACTGCTTTTTCTATAAGATGAATAAGGACTACGTGTAGTTCGATGACCGTATTATAGGAATAAGCAT  
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTAGGTTTAA  
AGGGTGCGTAGGTGGGCGTTTAAAGTCAGTGGTTAAAGCCAATAGCTTAACTATTGTATGCCATTGAAACT  
GGATGTCTTGAATAGGGTAGAGGTAGGCGGAATGTGTTGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATAACACAG  
AACACCGATTGCGAAGGCAGCTTACTATGCCTTTATTGACACTGATGCACGAAAGCGTGGGGATCAAACA  
GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGATCACTCGTTTTTG

**>ATB-KS-1947 [EF686993]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGATGAACGCTAGCGATAGGCTTAACACATGCAAGTCGAGGGGCAGCACAG  
GCAGCAATGTTGGGTGGCGACCGGCGCACGGGTGCGTAACACGTATGCAACCTGCCTGTAAGCGTGGGAT  
AGCCTCCTGAAAGGGAGATTAATACCGCATAACATGTAGAATCCGCATGGATTTTACATCAAACATTTAT  
GGCTTACAGATGGGCATGCGTTCCATTAGGCAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAACCTACGATGGATA  
GGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GAGGAATATTGGTCAATGGTCGAGAGACTGAACCAGCCAAAATCGCGTGAAGGACGACGGCCCTATGGGTT  
GTAAACTTCTTTTACAGGGGAATAAAGTGCTCCACGTGTGGAGTTTGTATGTACCCTGTGAATAAGCAT  
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAA  
AGGGTGCGTAGGCGGGACCATAAGTCAGCGGTGAAAGTTTTCGGCTCAACCGGAAAAATTGCCGTTGAAAC  
TGTGGTTCTTGAGTGCAGAAGAGGTAGGCGGAATTCGTTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAACGAA  
GAACACCAATTGCGTAGGCAGCTTACCATACTGCAACTGACGCTGAGGCACGAAAAGTGTGGGTATCAAAC  
AGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATGAATACTAGCTGTT

**>ATB-KS-1949 [EF686994]**

AGAGTTTGCATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAATACATGCAAGTCGAGCGAGGTTATCT  
TTTCAAAGCCCTTCGGGGTGGCGAATTTTAACTAGCGGCGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAATCTG  
CCCTAAAGCCCCGGGATAACAGCGGGAACTGCTGCTAATACCGGATAGCTTTATCTGGAGGCATCTTCGG  
ATAAGGAAACGTAAGGCTTTAGGATGAGCCCCGCGTCCCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAA  
GGCGACGATGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA  
CGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTGCGCAATGGAGGGAACCTCTGACGCAGCGACGCCGCGTGAGCGATGA  
AGGTCTTCGGATCGTAAAGCTCTGTCTTGGGGAAGAAGGTCTTCGGACTTGACGGTACCTAAGGAGGAA  
GCCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC  
GTAAAGGGTGCGTAGGCGGCCTTTTAAAGTCAGATGTGAAAGCCACGGCTTAACCGTGGGACTGCATTTG  
AACTGGAGGGCTTGAGTATCGGAGAGGGTAGTGGAATTCAGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATTG  
GGAGGAACACAGTGGCGAAGGCGACTACCTGGACGAAAACCTGACGCTGAGGCACGAAAAGCTAGGGGAGC  
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCTAGCCGTAAACGATGTCTAAGGACTTGCTAGTGACACACTGAA  
AGAAGGTTGGGCAGC

**>ATB-KS-1950 [EF686995]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACACATGCAAGTCGAACGGAGAAAGGG  
TAGCTTGCTATCTTTTCTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACCTACCTTTGCAGGGGGAT  
AACAGCGAGAAATCGTTGCTAATACCGCATACAAAGTTTCTTTTCGCATGAAAGAACTTAAAAGATTTAT  
CGGCAAAGGATGGACCCGCGTTGGATTAGCTAGTTGGTGAGATAACAGCCCACCAAGGCAACGATCCATA  
GCCGGCCTGAGAGGGTGAACGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
GGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAAGGATGAAGGTCTTCGGATTG  
TAAACTTCTATCAGCAGGGAAGAAAGGGCCTTAAGGTCTATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCTA  
ACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGTG  
CGTAGGTGGTTATGTAAGTTTGTATGTGAAACCTTAAGGCTTAACCTTAAGCATGCATCAAAAACCTATATA  
ACTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACAC  
CAGTAGCGAAGGCGGCTTTCTGGACTGTAACCTGACACTGAGGCACGAAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATT  
AGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTCG

**>ATB-KS-1951 [EF686996]**

AGAGTTTGCATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGTAGGCTTAATACATGCAAGTCGAGGGGCAGCACGG  
GTAGCAATACTTGGTGGCGACCGGCGAATGGGTGCGTAACGCGTATGCAACCTACCTATAACTGGGGCAT  
AGCTCAGAGAAATCTGAATTAATTTCCATAATACCATTACTTGGCATCAAGTTTTGGTTAAAGTTCTGA  
CGGTTATAGATGAGCATGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCTACGATGTCTA  
GGGGTTCTGAGAGGATACACCCCCACACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT  
AGGGAATATTGGGCAATGGACGCAAGTCTGACCCAGCCATGCCGCGTGACAGGATGACAGCCTTATGGGTT  
GTAAACTGCTTTTATTTCGGGAAAAAACTTTTCGGACGTGTCCGGAATTGATGGTACCGTTTGAATAAGCAT  
CGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGTTTAA  
AGGGTGCGCAGGCGGATTTGTAAGTCAGTTGTGAAATCCTGTGGCTTAACCTACAGAACTGCAATTGATAC  
TGCAAGTCTAGAGTTTAGTTGAAGTGACTGGAATGTGTCATGTAGCGGTGAAATGCAAGAGATGACACA  
GAACACCGATAGCGAAGGCAGGTCACCTAAGCTAATACTGACGCTCAGGCACGAAAAGTGTGGGGGATCAAA  
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACACTGTAAACGATGATAACTAGTTGT



**>ATB-KS-1952 [EF686997]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGGATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATCATCC  
TTTCGGGGGTGAGAGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTAGGTTATCTACCCCTCAAGACGGGGACAACC  
CAGGGAAACTTTGGGCTAATAACCGGATGTGAGCAACTTTTTAGTTGTTTGAAAGGTGGCGTAAGCTGTTCGC  
TTGGGGATGAGCCTGCGTCCTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCTAGGCAATGATAGGTAGGC  
GGCCTTAACGGGTGGTCGCCCACACTGGGATTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTCGA  
GAATAGTCTACAATGGTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGATGAATCCCTTCGGGGTGTA  
AGTTCTTTTATATGTGAGCAGTGCTTCTTATATTAAGAGTATGGGGAGAGAGATATTAGCATATGAATAA  
GCAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAGGC  
GTAAAGGGCAGGCAGGCGGATCCATAAGTTTATCGTTTAAGGCGTCGGCTTAACCGGCGTAGGGCGGTAG  
ATACTGTGGATCTGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGATGCGGTGGAATGCGCAGAGATCA  
GGAGGAATACCGAAGGCGAAGGCAGTCTTCCAAGCCGTTATTGACGCTCAACTGCGAAGGTGTGGGTATC  
AAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATAATCACTGGGTG

**>ATB-KS-1953 [EF686998]**

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGGGTTTACG  
GAGCAGCTTGCTGCACTGTAAACCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCTTACACAG  
GGGGATAACACTGGGAACTAGTGCTAATAACGCATAACATCATTTTATGGCATCATGAGATGATCAAAG  
GAGCAATCCGGTGTAAGATGGGCCCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACAGCTCACCAAGGCAGC  
GATCGGTAGCCGAACAGAGGTTGGTCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAGACTCCTACGGGAG  
GCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGGGGAACCCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAAGGATGAAGGCCT  
TCGGGTTGTAACTTCTTTGATTGGGGAAGAAATTTGACGGTACCCAAAGAACAAGCCACGGCTAACTAC  
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCGAGCGTTGTCCGGAATTACTGGGTGTAAAGGGCGTGTAG  
GCGGGGATGCAAGTCAGATGTGAAATTCGGGGCTCAACCCCGGCACTGCATCTGAAACTGTGTCTCTTG  
AGTGCTGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAGGAACACCAGTG  
GCGAAGGCGACTTTCTGGACAGTAACTGACGCTGAGGCGCGAGAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATA  
CCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGGATACTAGGTGTAG

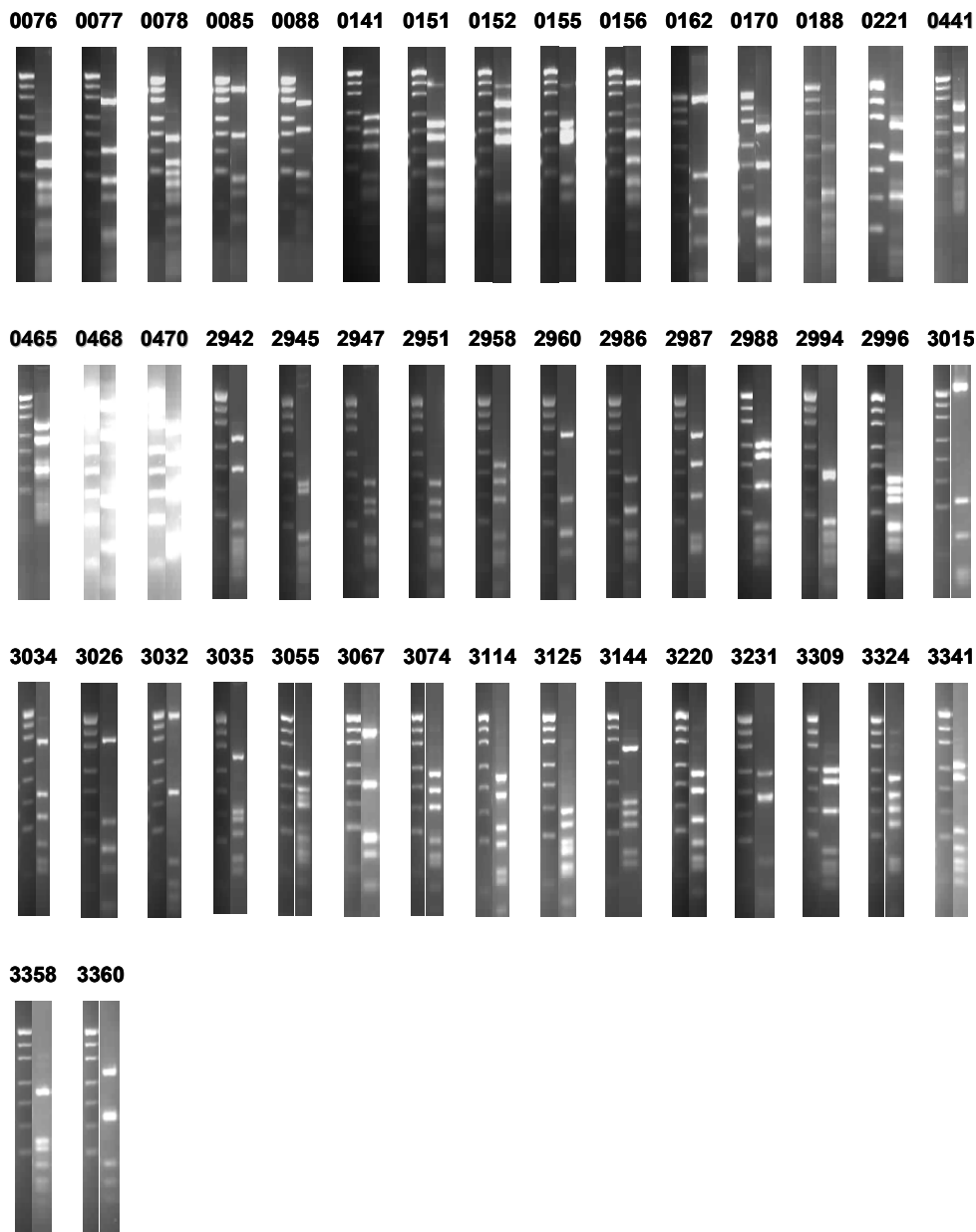
**>ATB-KS-1955 [EF686999]**

AGAGTTTGATCATGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGGATTAGGCATGCAAGTCGAACGGTATGGTGC  
TTTCGGGCATCAGAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTAGGTAATCTACCCCTCAAGACGGGGACAACC  
CAGGGAAACTTTGGGCTAATAACCGGATGATAGCAGCAGCGATGTTGTTTAAAAGATGGCTTTCGGGCTGTC  
GTTTGGGGATGAGCCTGCGTCCTATTAGCTAGTTGGTGTTGTAAGGCACACCAAGGCGATGATAGGTAG  
GCGGCCTTAACGGGTGGTCGCCCACACTGGGATTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTC  
GAGAATAGTCTACAATGGTCGGAAGACTGATAGTGCGACGCCGCGTGAACGAGGAAGCCCTTCGGGGTGT  
AAAGTTCTTTTATATGTGAGCAGTGGGTTCTACGTTAATAGCGTGGGATCAGGGATATTAGCATATGAAT  
AAGCAACGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAACACGGGGGTTCGAGCGTTGTCCGGAATTACTAG  
GCGTAAAGGGCAGGTAGGCGGATCTATAAGTTTTTTGTCAAATTCACGGCTCACCCGTTGCGCGGCAGG  
AGATACTGTAGATCTGGAATGCGGTTGGGGAAGACAGAATTCCTGGTGATGCGGTGGAATGCGCAGAGAT  
CAGGAGGAATACCTAAGGCGAAGGCAGTCTTCTAAGCCGTAATTGACGCTAAACTGCGAAGGTGTGGGTA  
TCAAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCACACAGTAAACGATAATCACTGG

**ARDRA-Muster (Archaea)**

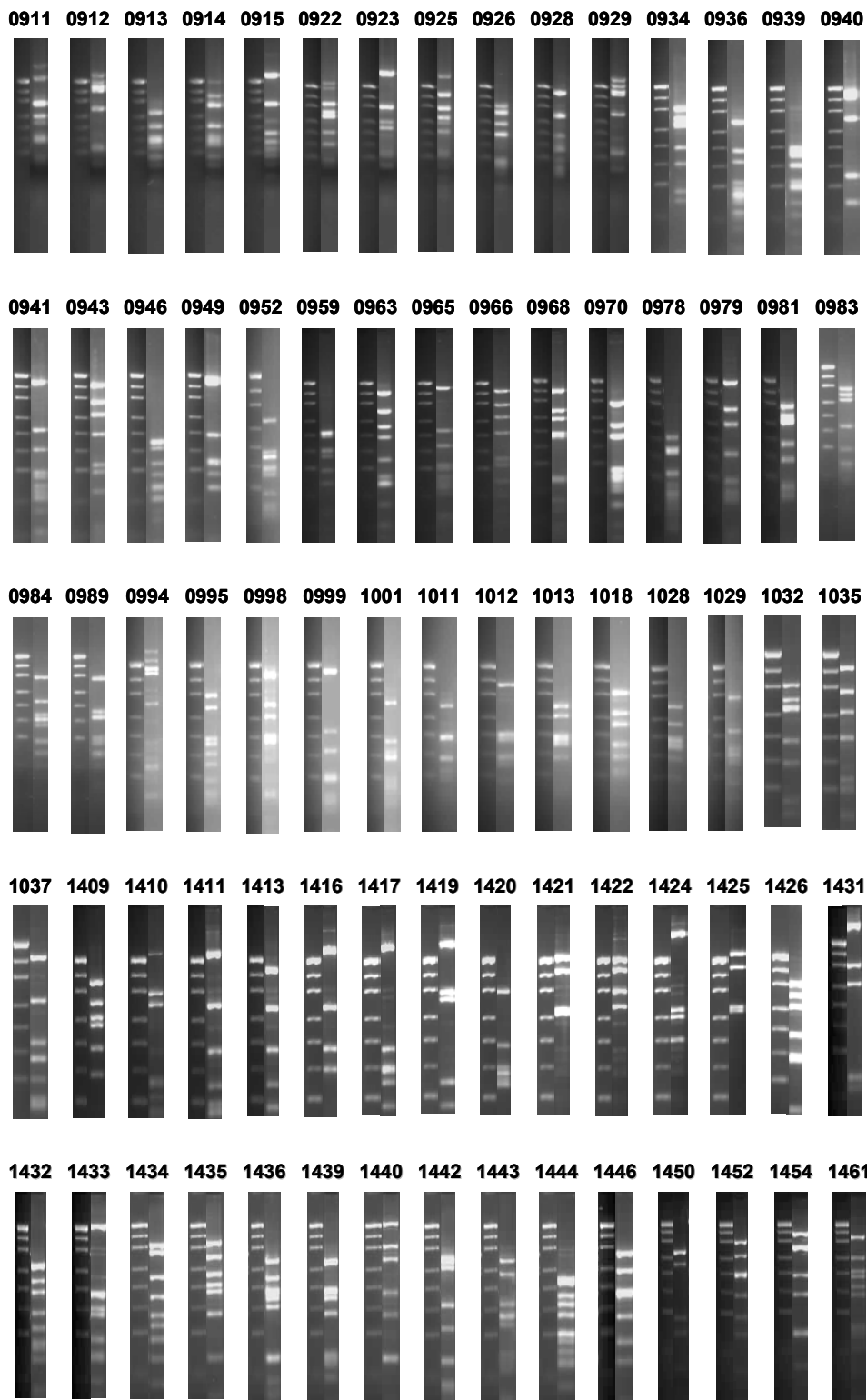
Nomenklatur der ARDRA-Muster:

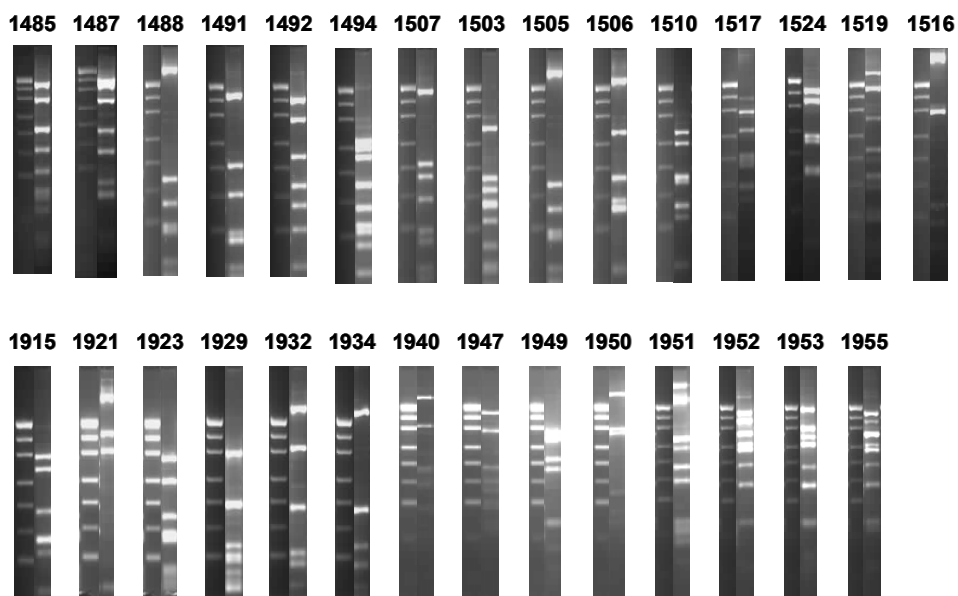
ATB-KS-[Stammnummer<2000] bzw. ATB-KM-[Stammnummer>2000]



**ARDRA-Muster (Bacteria)**

Nomenklatur der ARDRA-Muster: ATB-KS-[Stammnummer]





## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt,

dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig

und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel

angefertigt worden ist.

Berlin, den

---

Khadidja Souidi